

(書誌+要約+請求の範囲)

(19)【発行国】日本国特許庁(JP)

(12)【公報種別】公表特許公報(A)

(11)【公表番号】特表2002-525051(P2002-525051A)

(43)【公表日】平成14年8月13日(2002.8.13)

(54)【発明の名称】ヒトGタンパク質のGベータ3サブユニットのための遺伝子内の遺伝子変更

(51)【国際特許分類第7版】

C12N 15/09	ZNA	A01K 67/027	A61K 38/00
48/00		A61P 3/04	3/10
9/06	9/10		9/12
25/28		31/18	37/02
43/00	111	C07K 14/47	C12P 21/02
21/08		C12Q 1/68	G01N 33/15
33/50			

【F I】

A01K 67/027	A61K 48/00	A61P 3/04
3/10	9/06	9/10
19/10	25/28	31/18
37/02	43/00 111	C07K 14/47
21/02	C 21/08	C12Q 1/68 Z
33/15	Z 33/50	C12N 15/00 ZNA A
37/02		A61K

【審査請求】未請求

【予備審査請求】有

【全頁数】91

(21)【出願番号】特願2000-570312(P2000-570312)

(86)(22)【出願日】平成11年9月6日(1999.9.6)

(85)【翻訳文提出日】平成13年3月12日(2001.3.12)

(86)【国際出願番号】PCT/EP99/06534

(87)【国際公開番号】WO00/15785

(87)【国際公開日】平成12年3月23日(2000.3.23)

(31)【優先権主張番号】19841299.1

(32)【優先日】平成10年9月10日(1998.9.10)

(33)【優先権主張国】ドイツ(DE)

(31)【優先権主張番号】19904825.8

(32)【優先日】平成11年2月5日(1999.2.5)

(33)【優先権主張国】ドイツ(DE)

(31)【優先権主張番号】19912049.8

(32)【優先日】平成11年3月18日(1999.3.18)

(33)【優先権主張国】ドイツ (DE)

(31)【優先権主張番号】 199 14 229. 7

(32)【優先日】平成11年3月29日 (1999. 3. 29)

(33)【優先権主張国】ドイツ (DE)

(31)【優先権主張番号】 199 19 989. 2

(32)【優先日】平成11年4月30日 (1999. 4. 30)

(33)【優先権主張国】ドイツ (DE)

(31)【優先権主張番号】 199 23 539. 2

(32)【優先日】平成11年5月21日 (1999. 5. 21)

(33)【優先権主張国】ドイツ (DE)

(81)【指定国】EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71)【出願人】

【氏名又は名称】ジフェルト, ビンフリート

【住所又は居所】ドイツ連邦共和国, デー-45147 エッセン, シェーンラインシュトラッセ 49

(72)【発明者】

【氏名】ジフェルト, ビンフリート

【住所又は居所】ドイツ連邦共和国, デー-45147 エッセン, シェーンラインシュトラッセ 49

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】石田 敬 (外4名)

【テーマコード (参考)】

2G0454B0244B0634B0644C0844H045

【Fターム (参考)】

2G045 AA40 DA36 FB03 4B024 AA01 BA44 CA02 DA03 HA11 4B063 QA17 QA19 QQ02 QQ43 QR08  
QR32 QR42 QR55 QR62 QS25 QS36 QX02 4B064 AG01 AG27 CA10 CC24 DA01 DA13 4C084 AA02  
AA13 BA01 BA22 CA18 DC50 NA14 ZA162 ZA452 ZA662 ZA702 ZA812 ZA972 ZB072 ZC332 ZC352  
4H045 AA10 BA10 CA40 DA76 EA22 EA28 EA50 FA74

(57)【要約】

本発明は、ヒトG蛋白質のGベータ3サブユニットの遺伝子における遺伝子変化であって、付録2の825位におけるシトシンのチミンによる置換および/または付録2の1429位におけるシトシンのチミン

による置換である遺伝子変化の、G蛋白質調節不全に関連する疾患を発症するリスクを評価するための使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトG蛋白質のGベータ3サブユニットをコードする核酸配列であって、付録1に記載の配列を有する核酸配列。

【請求項2】 ヒトG蛋白質のGベータ3サブユニットをコードする核酸配列であって、付録2に記載の配列を有する核酸配列。

【請求項3】 ヒトG蛋白質のGベータ3サブユニットの遺伝子における遺伝子変化であって、付録2の825位におけるシトシンのチミンによる置換および／または付録2の1429位におけるシトシンのチミンによる置換である遺伝子変化の、G蛋白質調節不全に関連する疾患発症のリスクを評価するための使用。

【請求項4】 2型糖尿病、過体重および肥満症、高コレステロール血症、冠性心疾患、心筋梗塞、突然心臓死、骨粗鬆症、アテローム性動脈硬化症、免疫系の反応性増大に基づく神経変性もしくは脳血管状態、特にアルツハイマー病を発症するリスク、および／または勃起機能不全を発症しないことを評価するための、請求項3記載の使用。

【請求項5】 ヒトG蛋白質のGベータ3サブユニットの遺伝子における遺伝子変化であって、付録2の825位におけるシトシンのチミンによる置換および／または付録2の1429位におけるシトシンのチミンによる置換である遺伝子変化の、女性が心血管状態、特に高血圧もしくは冠性心疾患を発症するリスクを予想するため、または心血管リスクを下げるための特別なホルモン療法を調製するための使用。

【請求項6】 発端者のG蛋白質調節不全に関連する疾患を発症するリスクを評価するための方法であって、発端者のヒトG蛋白質のGベータ3サブユニットの遺伝子配列が付録1および／または付録2の遺伝子配列に匹敵し、かつ825位および／または1429位で付録2の遺伝子配列に一致する場合、発端者に高い疾患リスクがあるとする方法。

【請求項7】 2型糖尿病を発症するリスクを評価するために、IRS1遺伝子(3931A変異体; Gly971Arg)、IRS2遺伝子、PI3キナーゼのp85アルファ調節サブユニットをコードする遺伝子(1020G→A; コドン326Met→Ile)、ベータ3アドレナリン作動性受容体をコードする遺伝子(Trp64Arg)、ベータ2-アドレナリン作動性受容体をコードする遺伝子(ここでは特にArg16Gly変異体およびGln27Glu変異体)、腫瘍壊死因子アルファをコードする遺伝子、および／またはレプチンもしくはレプチン受容体をコードする遺伝子における遺伝子変化を同時に調べる、請求項6記載の方法。

【請求項8】 過体重および肥満症を発症するリスクを評価するために、IRS1遺伝子(3931A変異体; Gly971Arg)、ベータ3アドレナリン作動性受容体をコードする遺伝子(Trp64Arg)、および／またはベータ2-アドレナリン作動性受容体をコードする遺伝子(ここでは特にArg16Gly変異体およびGln27Glu変異体)における遺伝子変化を同時に調べる、請求項6記載の方法。

【請求項9】 冠性心疾患および／または心筋梗塞を発症するリスクを評価するために、IRS1遺伝子(3931A変異体; Gly971Arg)における遺伝子変化を同時に調べる、請求項6記載の方法。

【請求項10】 免疫系の反応性増大に関連する疾患を発症するリスクを評価するために、ベータ2-アドレナリン作動性受容体をコードする遺伝子(ここでは特にArg16Gly変異体およびGln27Glu変異体)における遺伝子変化を同時に調べる、請求項6記載の方法。

【請求項11】 妊娠中毒症を発症するリスクを評価するために、内皮NOシンターゼをコードする遺伝子(特にGlu298Asp変異体)における遺伝子変化を同時に調べる、請求項6記載の方法。

【請求項12】 AIDSを発症するリスク増大がホモ接合体のHIV陽性発端者が原因であるとする、請求項6記載の方法。

【請求項13】 AIDSを発症するリスクを評価するために、CCR5遺伝子における遺伝子変化を同時に調べ、AIDSを発症するリスクのさらなる増大がCCR5)32多形性に対するホモ接合体またはヘテロ接合体の発端者が原因であるとする、請求項12記載の方法。

【請求項14】 AIDSを発症するリスクを評価するために、CCR5遺伝子における遺伝子変化を同時に調べ、AIDSを発症するリスクのさらなる増大がCCR5P1対立遺伝子を有する発端者が原因であるとする、請求項12または13記載の方法。

【請求項15】 AIDSを発症するリスクを評価するために、SDF1-3'UTR-801G-A多形性に関する試験を同時に行い、AIDSを発症するリスクのさらなる増大がSDF1-3'A対立遺伝子を有する発端者が原因であるとする、請求項12記載の方法。

【請求項16】 ヒトG蛋白質のGベータ3サブユニットの遺伝子における遺伝子変化であって、付録2の825位におけるシトシンのチミンによる置換および／または付録2の1429位におけるシトシンのチミンによる置換である遺伝子変化の、高CO2または低酸素症耐容性を有する個人を特定するための使用。

【請求項17】 ヒトG蛋白質のGベータ3サブユニットの遺伝子における遺伝子変化であって、付録2の825位におけるシトシンのチミンによる置換および／または付録2の1429位におけるシトシンのチミンによる置換である遺伝子変化の、発端者のインビボでのホルモン、伝達物質（神経伝達物質も）、またはG蛋白質サブユニットGベータ3およびGベータ3sを含むG蛋白質ヘテロ三量体を活性化し、かつ／またはG蛋白質サブユニットGアルファSを刺激する薬剤に対する反応性を予測するための使用。

【請求項18】 発端者の反応性を予測するためと、同時にベータ2アドレナリン作動性受容体においてArg16Gly変異体およびGln27Glu変異体を検出するための、請求項17記載の使用。

【請求項19】 高血圧、真性糖尿病、冠性心疾患、心不整を伴うまたは伴わない急性心筋梗塞、心不整、および移植拒絶における治療の薬物体または非薬物体および薬剤またはホルモンの用量の特異的選択のための、請求項17または18記載の使用。

【請求項20】 血球生成に対するエリスロポエチン投与の有効性を予測し、かつ／またはこの治療中の高血圧発生を予測するための、請求項17または18記載の使用。

【請求項21】 免疫抑制療法、特にシクロスポリンによる療法中に高血圧を発症する危険性を予測するための、請求項17または18記載の使用。

【請求項22】 片頭痛発作の治療および予防のための物質の有効性を予測するための、請求項17または18記載の使用。

【請求項23】 ヒトG蛋白質のGベータ3サブユニットの遺伝子における遺伝子変化であって、付録2の825位におけるシトシンのチミンによる置換および／または付録2の1429位におけるシトシンのチミンによる置換である遺伝子変化の、発端者のインビボでのベータアドレナリン受容体遮断薬に対する反応性を予測するための使用。

【請求項24】 ヒトG蛋白質のGベータ3サブユニットの遺伝子における遺伝子変化であって、付録2の825位におけるシトシンのチミンによる置換および／または付録2の1429位におけるシトシンのチミンによる置換である遺伝子変化の、発端者のインビボでのプロスタグランジンE1作用を有する物質、特にプロスタグランジンE1に対する反応性を予測するための使用。

【請求項25】 疾患の治療または予防のためのアンチセンス薬剤を生産するための、請求項1または2に記載の核酸配列に相補的な核酸配列の使用。

【請求項26】 Gベータ3sの機能を阻害する化学物質を同定するための、組み換え系における、または

適当な細胞系統にトランスフェクションした後のヒトG蛋白質のGベータ3サブユニットの使用。

【請求項27】 Gベータ3サブユニットが付録4に示すアミノ酸配列を有する、最大6つのWD反復モチーフを有するヒトG蛋白質のベータ3サブユニット。

【請求項28】 請求項27記載の蛋白質をコードする核酸配列。

【請求項29】 配列が付録3に示されている、請求項28記載の核酸配列。

【請求項30】 請求項27から29のいずれか一項記載の蛋白質を生成するための方法であって、請求項28または29のいずれか一項に記載の核酸配列が適当な調節シグナルと共に任意に提供され、宿主生物中での発現へと誘導される方法。

【請求項31】 発現が免疫不全、特にHIV陽性の個人の免疫細胞において起こる、請求項30記載の方法。

【請求項32】 発現がヒト体細胞において起こる、請求項30記載の方法。

【請求項33】 G蛋白質調節不全に関連する疾患の治療のための薬剤を生産するための、請求項28または29記載の核酸配列の使用。

【請求項34】 トランスジェニック動物を作製するための、請求項28または29記載の核酸配列の使用。

【請求項35】 G蛋白質調節不全に関連する疾患の治療または予防のためのアンチセンス薬剤を生産するための、請求項28または29記載の核酸配列に相補的な核酸配列の使用。

【請求項36】 蛋白質に対する抗体を産生するための、請求項27記載の蛋白質の使用。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

本発明は、ヒトGタンパク質のGベータ3-サブユニットをコード化する新規核酸配列及びGタンパク質のGbeta3サブユニットにつき、Gタンパク質調節不全に関連する疾病を発現する危険性を測定する際における利用に関する。

##### 【0002】

ヘテロ三量体グアニンヌクレオシド結合タンパク質（Gタンパク質）は、細胞内信号伝達において特に重要なものである。Gタンパク質は、受容体活性化後に構造変化を起こすホルモン受容体や他のレセプターが刺激を受けた後に、細胞内信号の中継を仲介する。このことは、Gタンパク質の活性化が導びかれ、次いで細胞内のエフェクターの活性化或いは阻害することになる（例えばイオンチャンネルや酵素）。Gタンパク質は細胞膜に存在するヘプタヘリカル受容体へのホルモン刺激後の細胞内信号処理を制御するが、固有のチロシンキナーゼ活性による受容体刺激後も行なう。制御される細胞機能には、特に他の細胞分裂や細胞成長、収縮、細胞内容の放出及びその他が含まれる。

##### 【0003】

ヘテロ三量体Gタンパク質は3つのサブユニットである、アルファ、ベータ及びガンマサブユニットから構成されている。これまで、数種の異なるアルファサブユニット、5つのベータサブユニット及び凡そ12のガンマサブユニットが生化学的及び分子生物学的方法で見出されている（Birnbaumer, L. and Bimbaumer, M., Signal transduction by G proteins: 1994 edition. J. Recept. Res. 15: 213-252, 1995; Offermans, S. and Schultz, G. Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 350: 329-338, 1994; Nuernberg, B., Gudermann, T. and Schultz, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2, G proteins: structure and function. J. Mol. Med. 73:123-132, 1995; Neer, E.J. Heterotrimeric G protein: Organizers of Transmembrane Signals. Cell 80: 249-

257, 1995; Rens-Domiano, S. and Hamm, H.E. Structural and functional relationship of heterotrimeric G proteins. *FASEB J.* 9: 1059-1066, 1995)。

ある種のアルファサブユニットのレセプター介在活性化は、百日ぜき(PTX)による前処理で阻害をすることができる。それらは、特にアルファイソ型であるアルファ-11、アルファ-12 及びアルファ-13 及び異なるアルファサブユニットを含んでいる。これらのGタンパク質は“PTX-感受性Gタンパク質”と称されている。

#### 【0004】

ベータガンマサブユニットはGタンパク質活性化及び細胞内反応の調整において重要な働きを行う。全ての既知のGタンパク質ベータサブユニットは、ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列のレベルでは高い相同性を有している。この点で、これらの類似性はヒトベータサブユニット(Gベータ1、Gベータ2、Gベータ3)の間だけではなく、他の種である例えばミバエや酵母のベータサブユニットと比較しても見出される。

#### 【0005】

最近、エキソン9の選択的スプライシングを導くエキソン10(C825T)における塩基交換は、Gベータ3サブユニットをコード化しているヒトGNB3遺伝子の中に記述されていた。選択的スプライシングは、エキソン9の不明なスプライス部位で促進されるが、スプライシングを強める位置から遠く離れた塩基交換C825Tである。選択的スプライスの生成物(Gベータ3s)は123 bp(41アミノ酸)を失っている。GNB3-825T対立遺伝子は、Gタンパク質の高められた活性化能及び本態性高血圧と関連している。(Siffert, W., Rosskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jacobs, K.H., and Horsthemke, B. Association of a human G protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat. Genet.* 18(1): 45-48, 1998; Clapham, D.E. and Neer, E.J. G protein betagamma subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:167-203, 1997; Hamm, H.E. and Gilchrist, A. Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:189-196, 1996)。

#### 【0006】

このGNB3遺伝子についてはLevine等が記述している(Levin, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T. Jr., Helman, L.J. and Ahn, T.G. Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(6), 2329-2333(1990))。

本発明の主題とするものは、ヒトGタンパク質のGベータ3サブユニットに対する新規ヒトcDNAである。

#### 【0007】

意外にもGNB3遺伝子には”C1429T”と以後称する特別な多型が存在することが見出されている。この多型は、cDNAの1429の位置に存在している。これはプレmRNAのエキソン11に相当するが、3'非翻訳領域中のオープンリードフレームの外側である。

この多型は、既知のC825T多型と顕著な分布不均衡なので、殆ど全てのGNB3-825C対立遺伝子は遺伝子型1429Cを有し、殆ど全てのGNB3-825T対立遺伝子が遺伝子型1429Tを有している。かくしてこの多型C1429TはGタンパク質の活性化能の亢進を検出する際に、多型G825Tと同様に適している。

#### 【0008】

多型C1429Tにつき、Levine等が記述した如くcDNA配列と比較する。ここではcDNAの1429の位置でCがTで置き換わっている。

1381 qqcctgggtg gtatagggcg ttggccctg tgactatggc tctggcac(c/t)a ctagggtcct 全cDNA配列は付表1に掲載してある。

#### 【0009】

Ansai-Lari 等が記述したように GBN3 遺伝子座の遺伝子配列と比較すると、(Ansai-Lari, M.A., Muzny, D.M., Lu, J., Lu, F., Lilly, C.E., Spanos, S., Malley, T. and Gibbs, R. A. A gene-rich cluster between the CD4 and triosephosphate isomerase genes at human chromosome 12p13. Genome Res. 6(4), 314-326(1996)) ,この多型は以下のように位置している (C59308T) : 59281 TTGGCCCTGT GACTATGGCT CTGGCAC(C/T)AC TAGGGTCCTGGCCCTCTTCT TATTCATGCT 全遺伝子配列は付表 2 に記載した。

【0010】

この多型は、技術に習熟したヒトには周知の方法である特異ハイブリデーション、配列決定、PCR 反応とそれに伴う制限分析、DNA チップ技術、一本鎖立体配座多型などを用いて検出する。1 試料試験では、検出は相当する遺伝子区画の増幅及びそれに続く制限 BanI, BshNI, Eco64I 又はそのアイソシゾマーを使用する制限断片長多型の分析で行なわれる。

【0011】

その結果、位置 825 と 1429 の遺伝子型の間には良い一致がある。

【0012】

【表 1】

【0013】

新規核酸配列は病気の治療や予防用のアンチセンス薬を生産するのに使うことができ、相補的核酸である 1 つの核酸配列はアンチセンス薬を生産する際に用いられる。そこでは患者は、G ベータ 3 サブユニットの転写又は翻訳を防止するのにアンチセンスオリゴヌクレオチド又はベクターなどで治療することができる。

本発明の主な内容は、更に G タンパク質のベータ 3 サブユニットを、G タンパク質調節不全に関係する病気を招く危険性を測定するのに利用することである。

【0014】

多型 C1429T を有したり、多型 C825T に寄与できる G ベータ 3s スプライス変異形は、G タンパク質サブユニットの G アルファ 2 及び G ガンマ 5 との組合せで機能的なヘテロ三量体を構成できるが、G ベータ 3s が G タンパク質の強化活性能をどうして導くかは判然としない。

本発明の主たる内容は、G ベータ 3s サブユニットが G タンパク質の活性能増強を導くことを見出したことに基づくものである。G タンパク質の活性化能増強は、相当する cDNA のトランスフェクション及び技術に習熟した者にはよく知られた COS-7 トランスフェクション系における G ベータ 3 及び G ベータ 3s の発現を通して検知される。ここで G ベータ 3s のトランスフェクション後における G タンパク質の活性能増強は、G ベータ 3 と比べて明確に強められている(図 1)。G タンパク質の活性能増強を定量するには、ペプチドのマストパラン-7 (Mas-7)による刺激後における G タンパク質アルファサブユニットへの放射性標識 [35S] GTP ガンマ S 取り込みを測定する。

【0015】

同様な結果が昆虫細胞発現系で達成できた (図 2)。ここで、m2-ムスカリン受容体は、Sf9 系において G タンパク質サブユニット G アルファ 3 及び G ガンマ 5 或いは G ベータ 3 又は G ベータ 3-s と共に発現される。G ベータ 3 存在下、拮抗剤カルバコールで刺激した後、拮抗剤カルバコールの効力亢進及び効率向上が G タンパク質の刺激能に関して認められた。

【0016】

これらの実験は、スプライス変異形 G ベータ 3-s が本来 G タンパク質の活性化増強を担っていることを示している。更に、これらの実験は、そのタンパク質は、このような G タンパク質調節不全と関連している

疾病の遺伝子治療を、細胞反応性増強で行なうのに適していることが判明した。

Gタンパク質調節不全と関連している疾病は、Gタンパク質が信号伝達に参与しているのに生理的機能を果たさない病気であると言える。調節不全は構造遺伝子における変化又は変性遺伝子の発現のような一連の原因を有する。本発明は、上記 GNB3-825T 対立遺伝子又は GNB3-1429 対立遺伝子と関連した病気に関する。それらは糖尿病 (II 型)、肥満及び脂肪過多症、冠状心臓病、免疫系の増感した結果の免疫症及び早産の危険性を伴う危険な妊娠を含んでいる。

【0017】

以下の例は GNB3-825T 対立遺伝子についての研究に関する。位置 825 及び 1429 における遺伝子型間での広範囲な一致 (共役平衡) の結果、実験結果から導かれるこれらの例及び結論は GNB3-1429T 対立遺伝子にとって同様に有効である。

1. 糖尿病 (II 型) の予知 II 型糖尿病 (別称: 成人糖尿病、インシュリン非依存型糖尿病) は高心臓血管罹患性及び高死亡率の悪質な疾病である。遺伝的影響及び肥満は病気の発生に強く関与している。II 型糖尿病はしばしばインシュリン抵抗性として始まり、当初はインシュリン分泌が増加することにより補われるので冒されたヒトにも症状がなく推移する (正常血糖の)。ただ増加したインシュリン分泌は維持できないので血液中の糖値が増加して糖尿病が起こる。インシュリン信号変換の成分、例えばインシュリン受容体基質 I(IRS-1)、PT-3 キナーゼ、タンパク質キナーゼなどでの細胞レベル変化がインシュリン抵抗性を起こす。しかし Gタンパク質結合受容体を活性化する拮抗剤 (例えばアンジオテンシン II) による細胞刺激の後でも細胞性インシュリン抵抗性が惹起される。それに引き続くインシュリンによる刺激作用は明らかに減少する。Polonsky, K.S., Sturis, J. and Bell, G.I. Non-insulin dependent diabetes mellitus- A generally programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. N. Engl. J. Med., 334: 777-783, 1996; O'Doherty, R.Stein, D. and Foley, J.Insulin resistance. Diabetologia 40 Suppl 3:B10-5:B10-5;B,1997; Kahn, C.R., Vincent, D., and Doria, A. Genetics of non-insulin dependent (type-II) diabetes mellitus. Annu. Rev. Med. 47:509-531, 1996; Hansen, T., Andersen, C.B., Echwald, S.M., Urhammer, S.A., Clausen, J.O., Vestergaard, H., Owens, D., Hansen, L. and Pedersen, O. Identification of a common amino acid polymorphism in the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase: effects on glucose disappearance constant, glucose effectiveness, and the insulin sensitivity index. Diabetes 46(3): 494-501, 1997; Folli, F., Kahn, C.R., Hansen, H., Bouchie, J.L and Feener, E.P. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle at multiple levels - A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin crosstalk. J. Clin. Invest. 100:2158-2169,1997; Zhang, Y., Wat, N., Stratton, I.M., Warren-perry, M.G., Ortho, M., Groop, L. and Turner, R.C. UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and b3-adrenergic receptor mutations to insulin to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. Diabetologia 39:1505-1511, 1996; Alming, K., Bjorback, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Echwald, S. and Pedersen, O. Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus, Lancet 342:828-832, 1993; Laakso, M., Malkki, M., Kekalainen, P., Kuusisto, J., and Deeb, S.S. Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin dependent diabetes. J.Clin.Invest 94:1141-1146, 1994)。

【0018】

この Gタンパク質活性化は、セリン残基部位で IRS-1 のリン酸化を導き、それによりインシュリンにより誘導されるチロシン残基でのリン酸化が抑えられる。その結果、インシュリン受容体及び PI-3 キナーゼでは IRS-1 の相互作用の低下がおこる。即ちインシュリン作用が減少する。GNB3 825T 対立遺伝子及び会



合したスプライス変種 G ベータ 3-s が起した G タンパク質の活性能増強は in vivo で明らかにインシュリン抵抗性の傾向を強める。

#### 【0019】

インシュリン抵抗性を導くインシュリン信号変換の成分 GNB3-825T に変異が複数同時に存在すると (IRS1 遺伝子、3931A 変種、Gly971Arg, p13 キナーゼの p85 アルファ調節サブユニット(1020G->A; コドン 326Met->Ile; ベータ 3 アドレナリン受容体 (Trp64Arg) ;ベータ 2-アドレナリン受容体 (ここでは特に Arg16Gly 変種 Gln27Glu 変種) ;腫瘍壊死因子アルファ ;レプチン又はレプチン受容体)、インシュリン抵抗性や糖尿病への傾向が急激に上昇することは知られている。この関連性で GNB3-825T 対立遺伝子に関連した II 型糖尿病の診断及びまだ健常なヒトにおける II 型糖尿病への遺伝的誘起傾向を苦痛も無く予知する可能性が開かれた。

#### 【0020】

700 人以上の II 型糖尿病患者及び 1400 人の対照健常人からの DNA を得て証明した。GNB3-825T 対立遺伝子及び IRS-1-Gly971Arg 変異形の頻度を比較した。表 1 に先ず対照及び症例における対立遺伝子頻度の比較を示した。

#### 【0021】

##### 【表 2】

#### 【0022】

n(人数)(%) は対立遺伝子及び糖尿病関連疾病に関する数値であり、平均(標準偏差)は連続変数についてである。1 は対照の女性に対して  $p < 0.001 (\chi^2 = 8.1)$  ; 2 は全対照に対して  $p < 0.001 (\chi^2 = 14.4)$  ; 3 は対照の男性に対して  $p < 0.001 (\chi^2 = 20.0)$  ; 4 は全対照に対して  $p < 0.005 (\chi^2 = 8.1)$  ; 5 は対照の男性に対して  $p < 0.01 (\chi^2 = 13.2)$  ; 6 は対照の女性に対して  $p < 0.14 (\chi^2 = 3.1)$  次の表 IIa 及び IIb は、GNB3-825T 対立遺伝子保因者或いは IRS-3931A 対立遺伝子保因者(単一効果、表 II.1) 又は両方の保因者(組合せ効果、表 II.2) の進行性 II 型糖尿病についての危険性を示している。危険性はここでは年齢調整した見込比で表してあるが、症例-対照研究での見込比は予知研究での相対危険性にほぼ相当している。

#### 【0023】

##### 【表 3】

#### 【0024】

##### 【表 4】

#### 【0025】

GNB3-825T 対立遺伝子又は IRS-3931A 対立遺伝子の保因者について、II 型糖尿病のはっきりした危険度増加は明らかである(表 II.1 及び表 II.2)。両方の遺伝子に変化があると、そのヒトにおける危険率は極度に上昇する。かくして GNB3-825T 対立遺伝子の検出で、冒された個人が II 型糖尿病を発病する可能性を確かめたり、既に生じた状態が遺伝的なものかを確かめるのに利用することができる。

#### 【0026】

2. 脂肪過多症/体重過剰の予測 体の大きさに対する体重の比率の尺度である、体重指数 (BMI) の規則性を多くの遺伝子につき測定した。体重過剰は遺伝的に決まるのは大まかに 40%であるが、カロリーを取りすぎなのに運動をしないことによっても起こる。G ベータ 3-s スプライス型は細胞成長増強の細胞表現型と結びついている。そこで、GNB3-825T 対立遺伝子は亢進した体成長、特に体重過剰、を起こしやすい

くうっ帯及び沈下うっ血を起こし得る。そうしている内に、糖尿病（II 型）のように遺伝子の中で、ベータ 3 アドレナリン受容体 (Trp64Arg 変異形) 或いはベータ 2 アドレナリン受容体、ここでは特に Arg16Gly 変異形及び Gln27Glu 変異形、をコード化している IRS1 遺伝子(3931A 変異形；gly97Arg)における変化との関連がありうる。

#### 【0027】

トランスジェニックマウスについての研究では IRS-1 タンパク質をコードした遺伝子の欠損は対照的に体の成長の重大な遅れを導くことを示した (Tamemoto, H., Kaowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., Sekihara, H., Yoshioka, S., Horikoshi, H., Furuta, Y., Iwaki, Y., Kasuga, M., Yazaki, Y., and Aizawa, S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1 Nature 372: 182-186, 1994)。

#### 【0028】

脂肪過多症と GNB3-825 ヌクレオチドの存在との関連及び Gly971Arg 変異形の存在する場合の IRS1 遺伝子の体質を検討するために、20～30 代の健常な男性の BMI を測定すると共に、Gly971Arg の存在につき GNB3-825 ヌクレオチドの体質及び IRS1 遺伝子の体質を検討した。結果は図 3 に示した。

図 3 は BMI につき測定した値の頻度分布を示した。より頻繁に IRS1“GG”遺伝子型が存在すると、BMI 上昇への顕著な傾向が GNB3-825T 対立遺伝子を GNB-C825 対立遺伝子と比較して検出できる。75%四分位数を 25%四分位数と比較するときの見込比は 2.5 である。反対に、GNB3-825T 対立遺伝子と同時に IRS1-3931A(Gly971Arg 変異形)を持つ保因者においては、BMI 上昇への傾向は明らかに反対に作用する。これは GNB3 と IRS1 が BMI へ示す反対作用効果を明らかにしている。こうして GNB3-825T 対立遺伝子の存在は脂肪過多症と信頼ある相関を示す。これらの対立遺伝子、特に IRS1-3931A 対立遺伝子 (Gly971Arg 変異形) を同時に欠損しているヒトにおいては脂肪過多症の傾向を予知することができる。

#### 【0029】

DE19619362A1 の例に記述したように、825T 対立遺伝子保因者は進行性高血圧の危険性が増大する。体重過剰及び脂肪過多症はかなり心臓血管症になりやすくするので、通常血圧で 825T 対立遺伝子の保因者の若者が体重過剰及び脂肪過多症の危険性増大性を有するか検討した。これを行なう為に正常血圧者の若者 277 人につき体の大きさ及び体重を測定し、血圧を測定した。体重過剰は BMI\$ 25.0kg/m<sup>2</sup> 及び脂肪過多症は\$ 27.0kg/m<sup>2</sup> として定義した。BMI と血圧値には明らかな相互関係が見られた。825T 対立遺伝子の頻度は直線的に BMI 四分位数 1 から 4 へと増加する。ホモ接合体 825T 対立遺伝子保因者について、次の危険率（見込比；OR）が計算される。

#### 【0030】

a) 体重指数\$ 25.0kg/m<sup>2</sup> 対体重指数<25 kg/m<sup>2</sup> (体重過剰対標準体重)：見込比 TT/CC=2.5 (1.1- 6.1; p = 0.03); 見込比 TC/CC 1.5 (0.8-2.6; p = 0.2) b) 体重指数\$ 27 kg/m<sup>2</sup> 対 体重指数<25 kg/m<sup>2</sup> (脂肪過多症対標準体重)：見込比 TT/CC=5.0 (1.4- 18.3; p = 0.0083)；見込比 TC/CC 2.2 (0.8 - 6.3; p = 0.13) こうして、825T 対立遺伝子の存在と体重過剰及び脂肪過多症傾向との間には明らかな関係が生じる。これは特にある程度まで過コレステロール血症、糖尿病、高血圧症及び冠状動脈性心疾患／心筋梗塞について 825T 対立遺伝子保因者の危険性亢進につき説明がつく。

#### 【0031】

#### 【表 5】

#### 【0032】

遺伝子型は n%で表し、連続変量は平均で表した（標準偏差）；fT = 827T 対立遺伝子頻度；BMI (体重指

数)は kg/m<sup>2</sup> で表した ; BP syst は収縮期血圧 ; BP diast は拡張期血圧 3. 冠状動脈性心疾患及びアテローム性動脈硬化症の予知 すでに冠状動脈性心疾患はGタンパク質調節不全と関連がありうることは知られている。冠状動脈製心疾患の発生と GNB3-825T 対立遺伝子の存在に関係があることを証明するために、血管造影法で冠状動脈製心疾患でないと判断した患者、冠状動脈製心疾患（心筋梗塞でない）患者、心筋梗塞の患者及び心筋梗塞が一箇所以上の患者に分けてこの対立遺伝子の存在を確認した。結果を図4に示す。

#### 【0033】

図4は、血管造影法で冠状動脈性心疾患でないと判断した患者(CHD)、冠状動脈性心疾患（心筋梗塞でない; MI）患者(CHD)、心筋梗塞の患者(MI)及び心筋梗塞が一箇所以上の患者について、GNB3-825T 対立遺伝子の頻度を示した。

CHD 及び MI では GNB3-825T の頻度の上昇が明らかである。CHD 及び MI についての危険率は GNB3-825T により CHD でない対照群と比べて凡そ2倍である。IRS-1 タンパク質(3931A 対立遺伝子 ; Gly971Arg 変異形)で変異を有する患者は、しかしながら GNB3-825 対立遺伝子又は GNB3-825T 対立遺伝子が存在しても明確に危険率低減が50%に達する。この IRS-1 タンパク質での変化はそれゆえ抑制効果を行なう。即ちこの変異形は冠状動脈性心疾患に対し防御するように働く。

#### 【0034】

CHD の患者と冠状血管造影では CHD でないとした人を比較すると、見込比は以下の通りである。

#### 【0035】

#### 【表6】

#### 【0036】

こうして GNB3-825T 対立遺伝子の存在と冠状動脈性心疾患の発生との相関性が証明された。そこで、この対立遺伝子の保因者における冠状動脈性心疾患の傾向が予知可能で、特に IRS1-3931A 対立遺伝子 (Gly971Arg 変異形) を欠損している患者は可能である。

特別な応用の一例は、冠状動脈性心疾患の予知であるが、一般的には心血管危険率を減ずる為に女性ホルモンによる閉経期ホルモン療法を受けている女性においての心臓血管危険性（高血圧など）である。

#### 【0037】

他の応用例は、心筋梗塞及び急性心臓死の危険性上昇の予知である。とりわけこれはイオンチャンネルを制御しているGタンパク質に関連している。更に正確には、Gタンパク質のGアルファ及びGベータガンマサブユニットが多様なイオンチャンネル、例えばNa<sup>+</sup>チャンネル、Ca<sup>2+</sup>及びK<sup>+</sup>チャンネルを制御している。更に正確には、全ての電気興奮性組織にとっては、これらのイオンチャンネルの調和した制御、特に心臓では重要な意味をもつ (De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E., Gurnett, C.A., and Campbell, K.P. Direct binding of G protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385 (6615); 446-450.1997; Ma, J.Y., Catterall, W.A., and Scheuer, T. Persistent sodium current through brain sodium channels induced by G protein betagamma subunits. *Neuron* 19(2); 443-452, 1997; Kofuji, P., Davidson, N. and Lester, H. A. Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels are activated by Ggamma subunits and function of heteromultimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6542-6546, 1995; Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., and Clapham, D.E. Gbetagamma binds directly to the G protein-gated K<sup>+</sup> channel, IKach, *J. Biol. Chem.* 270:29059-29062, 1995)。

#### 【0038】

GNB3-T825 対立遺伝子を有する人は心筋 K<sup>+</sup>チャンネルの活性が高められていることが知られていた。これは、心臓筋肉細胞の再分極性の亢進及び不応期時間の短縮へ導く。これらの人は心筋の不規則性、特に心室頻拍、期外収縮、心室粗動及び心室細動につき危険性が高まる。その人達は急性心筋梗塞の範囲内でもある急性心臓死の危険性が高まる。

【0039】

最後に、20～30 才である GNB3-825T 対立遺伝子の保因者は血管の性質に明らかな変化が現れる。特に、明らかなのは脈拍速度が早くなり、心拍出量が多くなり脈圧が増大する。これらの現象は、アテローム性動脈硬化症の指標としての血管硬化の亢進（柔軟性の減少）が早い時期に現れる。GNB3-825T 対立遺伝子体質を確かめる遺伝子型分類はアテローム性動脈硬化症の高まる危険性を確かめるのに適している。

【0040】

4. 血液中のコレステロール濃度上昇の予知 血中の全コレステロール濃度の上昇は、その人にとって冠状動脈性心疾患及び心筋梗塞の危険性が高まる原因であることは一般的に知られている。18～40 才の合計で 232 人につき GNB3 における C825T 多型につき遺伝子型分類をし、標準法で血清中の全コレステロール量を測定した。次いで、測定したコレステロール濃度 (mg/dl) を四分位数に分割し、GNB3 対立遺伝子に基づく遺伝子型を四分位数に割り付けた。825T 対立遺伝子の最も低い頻度が第一四分位数で 23.3%として見出され、四分位数 2～4 での 825T 対立遺伝子は明らかにより高かった。

【0041】

【表 7】

【0042】

n (%)に相当する数字 中間値 (>181mg/dl; TT=19; TC=60; CC=50; 825T 対立遺伝子の頻度：38%)より高い遺伝子型分布と中間値より低い遺伝子分布を比較した（# 181mg/dl; TT=8; TC=34; CC=51; 825T 対立遺伝子の頻度：26.9%）場合、中間値より高い範囲のコレステロール値の危険率は以下のとおりである：見込比 TT/CC=2.4 (p = 0.053); 見込比 TC/CC = 1.8 (p<0.05) この結果、825T 対立遺伝子は高コレステロール血症の危険率上昇と関連している。

【0043】

こうして、GNB3 対立遺伝子についての遺伝子型分類は、高いコレステロール値を下げる薬剤で治療している人の症状につき高コレステロール血症の危険性が増大するかを確認する上での可能性を提供する。それには特に酵素 2-ヒドロキシ-3-メチル-グルタリル-補酵素 A レダクターゼ(HMG-CoA レダクターゼ)の阻害剤である、例えばシンバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン及び他の“スタチン”と呼ばれるものが含まれる。またシトステリン、シトスタノールエステル（食物中にも存在する）、繊維物質及び他のコレステロールを減少させる物質も含まれる。

【0044】

これらの薬剤はGタンパク質阻害剤として働くので、Gタンパク質調節不全に関係する病気の治療に使用することができる。

5. 免疫系機能増加の予測。

Gタンパク質およびGタンパク質結合レセプターはまた、免疫系の全ての細胞、特に、白血球に見出される。細胞の走化性は、主に、ヘテロ三量体Gタンパク質のβγサブユニットによって媒介される。したがって、GNB3-825T対立遺伝子は、免疫系の反応性を増加させるはずであり、特に、免疫防御を強化するはずである。

【0045】

実際、GNB3-825T対立遺伝子のキャリアの好中球は、ペプチドfMLPと比較して走化性が増加した(図5)。fMLPは、代表的な細菌ペプチドの宿主であり、走化性反応を刺激するペプチドである。したがって、これは当業者に周知の細胞の走化性反応測定用の試験系として使用される。fMLPレセプターは、公知のように、百日咳毒感受性Gタンパク質を活性化する。GNB3-825T対立遺伝子のキャリアの顆粒球がfMLP刺激走化性を強化することを示した記載は、 $\beta\gamma$ サブユニットの走化性が媒介されるという事実と一致する。

#### 【0046】

この現象を、他の白血球(例えば、リンパ球)中で同様に検出することができる。したがって、GNB3-825T対立遺伝子と免疫系の細胞(例えば、好中球、Tリンパ球(図6もまた参照のこと)またはBリンパ球)の走化性の増加との間には相関関係がある。

さらに、GNB3-825T対立遺伝子のキャリアでは、特に、接種後の免疫系細胞の増殖傾向の増大を観察する。

#### 【0047】

GNB3-825T対立遺伝子の健常なキャリアは、CD4/CD8の商の増加を伴う白血球およびCD4陽性Tリンパ球数(絶対数および百分率)の増加を示す。図6は、CD4リンパ球の増加を示す。逆に、GNB3-825T対立遺伝子のキャリアはまた、ケモカインレセプターにおける上記遺伝子の変化、特に、CCR5レセプターまたはこの遺伝子のプロモーター領域における $\Delta 32$ 欠失の検出に関連するHIV感染後のAIDSの発症傾向(図7も参照のこと)の増加を示す。

#### 【0048】

最後に、罹患した個体において、白血球由来の免疫調整物質、ホルモン、および他の物質の放出の増加が認められる(サイトカイン、インターロイキン、成長因子、抗体、血管作用物質)。この点について、免疫防御の強化はまた、移植拒絶の危険性を伴う器官または組織(腎臓、心臓、骨髄、肺、皮膚、肝臓など)の移植後に惹起される。さらに、これにより自己免疫状態(リウマチ、潰瘍性大腸炎、クローン病)および例えば皮膚、気道、または他の器官のアレルギー状態(例えば、神経皮膚炎、枯草熱、気管支喘息)の傾向を増大させる。これはまた、例えば、 $\beta 2$ アドレナリン作用性レセプターにおける他の遺伝子の変化(特に、本明細書中ではArg16Gly変異体およびGln27Glu変異体)の検出と組み合わせて認められる。

#### 【0049】

6. Tリンパ球機能増大の予測。Tリンパ球は、ヒト免疫系において重要な役割を果たし、細胞性免疫応答を媒介する。既に記載のように、特に、Tリンパ球の活性化能力の増大により、強化された免疫学的攻撃に供される移植器官(腎臓、肝臓、心臓、肺、脾臓など)が得られる。図7は、間質性細胞由来因子1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ )での刺激後のヒトTリンパ球の走化性の一例を示す。ホモ接合性C825対立遺伝子キャリア細胞と比較して、825T対立遺伝子キャリア細胞の走化性反応の増大は明白である。

#### 【0050】

同様に、825T対立遺伝子キャリアのTリンパ球は、他のケモカイン(例えば、RANTES)での刺激後に強力に応答する。この挙動は、走化性応答がヘテロ三量体Gタンパク質の $\beta\gamma$ サブユニットによって本質的に調節されているという事実による(Arai, H., Tsou, C. L. およびCharo, I. F. C-Cケモカインレセプター2Bでトランスフェクトしたリンパ球株における走化性: 移動指向性はGalpha i結合レセプターの活性化によって放出された $\beta\gamma$ 二量体によって媒介されることの証明, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 94(26), 14495~14499, 1997)。

#### 【0051】

8 2 5 T対立遺伝子キャリアのTリンパ球の活性化の強化はまた、ホモ接合性C 8 2 5対立遺伝子キャリアのTリンパ球と比較したこれらの細胞の増殖の増加で示される。

したがって、全体として8 2 5 TキャリアのTリンパ球は適切な刺激でより強力に反応する（これは増殖および走化性の増加で示される）と予測することができる。この挙動は、細胞性免疫防御の増加形態で明白であり、これは、特に、細胞性免疫防御が増大した条件および手術に関連する。移植器官（腎臓、肝臓、脾臓、骨髄、心臓など）に対する免疫学的攻撃は、本明細書中で特記されているはずである。したがって、8 2 5 T対立遺伝子キャリアはこれらの移植器官に対する急性または慢性拒絶反応発症の増加傾向があることを予想することができる。この拒絶反応は、移植片が8 2 5 T対立遺伝子のキャリアであるドナー由来である場合特に強化される。これは、これらのドナーの器官および組織が8 2 5 T対立遺伝子の存在下でレシピエントの細胞による免疫学的攻撃を増大させるように強力に反応するという事実による。さらに、急性または慢性感染における反応が強化される。

【0052】

7. AIDS進行の強化の予測。

Tリンパ球におけるHIVウイルスの増殖は、Gタンパク質の活性化を介して媒介される作用をでのケモカインレセプターの活性化によって増加される（Kinter, A., Catanzaro, A., Monaco, J., Ruiz, M., Justement, J., Mori, S., Arthos, J., Oliva, A., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., Ostowski, M., Hoxie, J., Offord, R., およびFauci, A. S., CCケモカインは、CD (+) T細胞におけるHIV-1のT向性株の複製を増大させる、シグナル伝達の役割、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95 (20), 11880~11885, 1998)。

【0053】

したがって、HIV感染後に、Gタンパク質の活性化が増加した8 2 5 T対立遺伝子キャリアのTリンパ球において、ウイルス増殖の増加が起これと予想することができる。したがって、この患者は、GNB 3遺伝子座上のC 8 2 5対立遺伝子にホモ接合性のHIV陽性患者よりHIV感染後の早い時期でのAIDS発症の危険性が増加している。以下に、5 1 5 HIV陽性患者および6 2 2 HIV陰性血液ドナーの遺伝子型分布を示す。

【0054】

【表8】

【0055】

健常なコントロール発端者とHIV陽性個体との間に遺伝子型分布の有意な相違が存在する ( $\chi^2$  二乗 = 4. 253, 1自由度,  $p = 0. 0392$ , 傾向についての $\chi^2$  二乗検定)。したがって、HIV陽性であるCC遺伝子型に対するTTのリスクは、1. 5である (1. 0 - 2. 3,  $p = 0. 035$ ,  $\chi^2$  二乗 = 4. 4)。

【0056】

AIDSを発症したHIV陽性患者群内での8 2 5 T対立遺伝子はさらに蓄積し、患者のCD-4陽性細胞数が1 mlの血液あたり200個未満に減少した。

【0057】

【表9】

【0058】

したがって、8 2 5 T対立遺伝子を保有するHIV陽性患者では、AIDS発症のリスクが増加する。ホ

モ接合性825対立遺伝子キャリアについては、ホモ接合性CCR5対立遺伝子キャリアと比較してリスクが倍増する(OR TT/CC=2.0 (1.0-3.9, p<0.05))。

したがって、GNB遺伝子座上の遺伝子型分類は、リスクの増加が、疾患の進行の強化(特に、AIDSウイルスの増殖の増加)を示すHIV陽性825T対立遺伝子キャリアであるとする可能性を提供する。

さらに、より迅速なCD4の現象のリスクは、可能性に関連する。

#### 【0059】

HIVウイルス感染(性的伝染)の枠組み内で、第1に、マクロファージ、単球およびランゲルハンス細胞が関与する。いわゆる「M向性」「R5」HIVウイルスは、これらの細胞に侵入するために、特に、CCR5型ケモカインレセプターを使用する。ホモ接合性CCR5)32欠失を検出することができる個体は、HIV感染のリスクが減少する。CCR5)32対立遺伝子がヘテロ接合性形態で存在する個体では、HIV感染から抗体陽転への間隔の延長または疾患進行の遅延が認められる(1. Quillent, C., Oberlin, E., Braun, J., Rousset, D., Gonzales-Canali, G., Metais, P., Montagnier, L., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., およびBeretta, A., CCR5遺伝子の2つの異なる遺伝変異の組み合わせによって付与されたHIV-1耐性表現型, Lancet 351 (9095), 14~18, 1998, 2. Mummidi, S., Ahuja, S. S., Gonzales, E., Anderson, S. A., Santiago, E. N., Stephan, K. T., Craig, F. E., O'Connell, P., Tryon, V., Clark, R. A., Dolan, M. J., およびAhuja, S. K., HIV-1疾患進行の比率の変化に関連するCCR5遺伝子座の家系およびケモカイン系遺伝子変異体, Nat. Med., 4 (7), 786~793, 1998, 3. Magierowska, M., Theodorou, I., Debre, P., Sanson, F., Autran, B., Riviere, Y., Charron, D., およびCostagliola, D., CCR5, CCR2, SDF1, およびHLA遺伝子の遺伝子型の組み合わせにより、ヒト免疫不全ウイルス1感染患者における長期非進行状態を予測することができる, Blood, 93 (3), 936~941, 1999, 4. Michael, N. L., Louie, L. G., Rohrbaugh, A. L., Schultz, K. A., Dayhoff, D. E., Wang, C. E., およびSheppard, H. W., HIV-1伝染および疾患進行におけるCCR5およびCCR2多形性の役割(コメントを参照のこと), Nat. Med., 3 (10), 1160~1162, 1997, 5. Fauci, A. S., HIV誘導性疾患の宿主因子および病原性, Nature, 384, 529~534, 1996。

#### 【0060】

対照的に、CCR5プロモーター(CCR5P1)における1つの変異体の存在は、特に、ホモ接合性CCR5P1キャリアにおいてAIDSの進行を早める。(Martin, M. P., Dean, M., Smith, M. W., Winkler, C., Gerrard, B., Michael, N. L., Lee, B., Doms, R. W., Margolick, J., Buchbinder, S., Goedert, J. J., O'Brien, T. R., Hilgartner, M. W., Vlahov, D., O'Brien, S. J., およびCarrington, M., CCR5のプロモーター変異体によるAIDS進行の遺伝的促進, Science, 282, 5395, 1907~1911, 1998)

疾患が継続するにつれて、ウイルス型が変化していわゆる「T向性」(X4)ウイルスが優勢となり、その後主にCD4陽性Tリンパ球を攻撃する。これらのウイルスは、Gタンパク結合CXCR4ケモカインレセプターを介して侵入し、その天然のリガンドには、特に、間質性細胞由来因子1 $\alpha$ (SDF1 $\alpha$ )が含まれる。一連のケモカイン(SDF-1 $\alpha$ , RANTESなど)は、CD4陽性T細胞においてT向性ウ

イルスの増殖を刺激し、百日咳毒感受性Gタンパク質を介したシグナル伝達が決定的に重要であるとみなされる。百日咳毒との細胞のインキュベーションによるGタンパク質の阻害は、特に低ウイルス数でのウイルス複製を減少させる。(Kinter, A., Catanzaro, A., Monnaco, J., Ruiz, M., Justment, J., Moir, S., Arthos, J., Oliva, A., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., Ostrowski, M., Hoxie, J., Offord, R., およびFauci, A. S., CCケモカインは、CD4 (+) T細胞におけるHIV-1のT向性株の複製を促進する、シグナル伝達の役割、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 95 (20), 11880~11885, 1998)。

#### 【0061】

逆に、825T対立遺伝子の存在下で、Gβ3-sおよびGβ3-s2の発現およびGタンパク質の活性化能力の増加およびこれらのウイルスの複製を示すのでAIDSの進行が増加するという結論を導き出すことができる。

SDF-1をコードする遺伝子の変化(開始コドンから数えて801の位置でのG→A移行)を、SDF1-3' UTR-801G-AまたはSDF1-3' Aとよぶ。ホモ接合性SDF1-3' Aは、AIDSへの進行の減少を示す。(Winkler, C., Modi, W., Smith, M. W., Nelsen, G. W., Wu, X., Carrington, M., Dean, M., Honjo, T., Tashiro, K., Yabe, D., Buchbinder, S., Vitteinghoff, E., Goedert, J. J., O'Brien, T. R., Jacobson, L. P., Detels, R., Donfield, S., Willoughby, A., Gomperts, E., Vlahov, D., Phair, J., およびO'Brien, S. J., SDF-1ケモカイン遺伝子変異体によるAIDS病原性の遺伝子制限。生存研究、血友病の進行および発症研究(HGDS)、多施設AIDSコホート研究(MACS)、多施設血友病コホート研究(MHCS)、サンフランシスコ市コホート(SFCC)(コメントを参照のこと)、Science, 279, 5349, 389~393, 1998)。

#### 【0062】

825T対立遺伝子キャリアのAIDS進行の強化を検出するために、HIVウイルスが性的に伝染した690人のHIV陽性同性愛者および異性愛者(男性および女性)を研究した。遺伝子型分類後、AIDS発症の1つの可能な定義を示す以下の疾患の終点を確立した。

1. AIDS. 本明細書では、AIDSを、AIDSを定義づける疾患またはCD4細胞数が200個未満と定義する。このAIDS定義は、疾患調節センター(Center of Disease Control)(CDC, Atlanta, USA)で1993年に改正されたAIDS定義に対応する。

#### 【0063】

2. CD4細胞数が200個未満である。

3. 最小CD4細胞数。

4. 最大ウイルス負荷。

図9は、遺伝子型に依存するKaplan-Meier曲線としてのAIDS診断に対する最初の陽性HIV試験の例を示す。図9は、ホモ接合性825T対立遺伝子キャリアがホモ接合性またはヘテロ接合性825C対立遺伝子キャリアより有意に早く1993年のCDC定義による終点AIDSに到達していることを示す。

#### 【0064】

図10は、最初の陽性HIV試験と200個未満のCD4細胞数の減少との間の間隔を示す。本明細書中では、ホモ接合性およびヘテロ接合性C825対立遺伝子キャリアと比較したホモ接合性835T対立遺



伝子キャリアの時間挙動が、同様に劇的に促進されている。

図11は、最初の陽性HIV試験および個々に最も低いCD4細胞数由来の時間挙動を示す。本明細書では、同様に、ホモ接合性およびヘテロ接合性C825対立遺伝子キャリアと比較して、ホモ接合性835T対立遺伝子キャリアにおいて有意に促進される。

【0065】

図12は、最初の陽性HIV試験と最大ウイルス負荷との間の間隔を示す。同様に、825T対立遺伝子キャリアは、ホモ接合性およびヘテロ接合性C825対立遺伝子キャリアより早く最大ウイルス負荷を有するリスクが明らかに増大することが示される。

7. 1. CCR5対立遺伝子状態への対応。以下で、)32欠失の存在に関連するCCR5対立遺伝子状態もまた研究した。95%の信頼区間(95%CI)と共に、以下の表に相対危険率(RH)を示す。

【0066】

遺伝的背景を考慮せずに、ホモ接合性およびヘテロ接合性C825対立遺伝子キャリアと比較して、ホモ接合性835T対立遺伝子キャリアについてのAIDSのリスクまたは200個未満へのCD4細胞レベルの減少はおよそ2倍であった。遺伝的背景を無視して、200個未満のCD4細胞数に達するためのCCR5)32対立遺伝子キャリアのリスクは、観察間隔で1.4の因子が増加する。以下では、825T対立遺伝子の効果を、CCR5野生型およびCCR5)32野生型で個別に研究する。ホモ接合性CCR5野生型の存在下では、AIDSのリスクまたは200個未満のCD4細胞数は、ヘテロ接合性C825対立遺伝子キャリアと比較して、ホモ接合性825T対立遺伝子キャリアではおよそ1.6である。

【0067】

ホモ接合性825T対立遺伝子キャリアについて本来保護として記載されていたCCR5)32遺伝子型の存在下では、ヘテロ接合性C825対立遺伝子キャリアと比較してほぼ3倍リスクが増加する。

GNB3 825遺伝子型状態およびCCR5遺伝子型状態ならびにAIDS進行COX比例ハザードモデル。

【0068】

【表10】

【0069】

RH=相対的ハザード、95%CI=95%信頼区間、GNB3=Gタンパク質β3サブユニット、TT-825Tのホモ接合性、TCおよびCC、C825のヘテロ接合性またはホモ接合性、CCR5 WT-CCR%野生型( )32欠失の非存在下)、PCRmax、最大ウイルス負荷に対する時間間隔、AIDS、1993年のCDC定義によるAIDSの発症の時間間隔、ns=有意差なし。

【0070】

したがって、HIV陽性患者について以下のようにまとめることができる。

1. GNB3における825T対立遺伝子のホモ接合性は、AIDSへの進行のリスクを増加させる。

2. この効果は、CCR5)32遺伝子型の存在下でさらに強化される。

8. CO<sub>2</sub>の増加または低酸素症耐性の予測。認められるように、Gタンパク質はまた、低酸素症または炭酸ガス過剰症による呼吸の衝動の調節に関与する(Prabhakar, N. R., Kou, Y. R., およびKumar, G. K., 頸動脈小体におけるGタンパク質, Biol. Signals, 4, 271~276, 1995, Cachero, T. G., Rocher, A., Rigual, R. J., およびGonzalez, C., 頸動脈小体における感覚伝達に対するフッ化物ならびにコレラ毒素および百日咳毒の効果, Am. J. Physiol. Cell Physiol., 269, C1271~C1279, 1

995)。

【0071】

GNB3-825T対立遺伝子を保有する発端者が $pCO_2$ を吸気して $CO_2$ 耐性が増加した場合、呼吸の衝動（分時呼吸量）が減少することが見出された。したがって、 $CO_2$ 耐性の増加により、特に、作業環境で $CO_2$ の蓄積が起こり得る個体のリスクの増加が示される。したがって、 $CO_2$ 感受性の減少により、例えば、 $CO_2$ の麻薬効果の枠組み内で、同時に起こる意識消失のリスクの増大を引き起こす。これを特に罹患するのは、専門のダイバー、トンネル作業員、パイロット、潜水艦乗組員などである。GNB3-825T対立遺伝子の検出に伴って、これらの個体が事故を起こすリスクを減少させるように確認および警告することができる。

【0072】

9. 骨粗鬆症の予測。

全身性骨粗鬆症は、更年期後の女性の最も頻繁な疾患の1つであり、骨折のリスクが増加する。Gタンパク質は、骨を再構成する過程に有意に関与する。したがって、Gタンパク質の活性化能力の変化は、骨粗鬆症のリスクに非常に関与する。(May, L. G. およびGay, C. V., 破骨細胞による酸産生の上皮小体ホルモン調節への複数のGタンパク質の関与, *J. Cell Biochem.*, 64 (i), 161~170, 1997, Gordeladze, J. O., Lund, H. W., Jablonski, G., およびBruland, O. S., 異なる骨形成の潜在性を有するヒト肉腫細胞株におけるGタンパク質の種々の発現、細胞増殖におけるG12の関与の証明, *J. Cell Biochem.*, 60, 95~106, 1996)。

【0073】

この場合、GNB3-825T対立遺伝子の女性のキャリアも同様に、骨粗鬆症のリスクの増加を示す。

10. アルツハイマー病の予測。

アルツハイマー病患者におけるGタンパク質の活性化能力の変化および $K^+$ チャネルの変化を記載した。さらに、 $\beta$ アドレナリン作用性レセプターの刺激後のアデニル酸シクラーゼ活性化の減少を記載した。これらの現象は、 $G\beta 3s$ スプライス変異体の発現での百日咳毒感受性Gタンパク質の活性化能力の増加に寄与し得る(Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E., およびNishimoto, I., アミロイド膜貫通前駆体のリガンド依存性Gタンパク質カップリング機能, *J. Biol. Chem.*, 270, 4205~4208, 1995, Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Yakahasi, S., Murayama, Y., およびOgata, E., 脳GTP結合タンパク質G0を含むアルツハイマーアミロイドタンパク質前駆複合体, *Nature*, 362, 75~79, 1993, Etcheberrigaray, R., Ito, E., Oka, K., Tofel-Grehl, B., Gibson, G. E., およびAlkon, D. L., 線維芽細胞におけるカリウムチャネル不全によりアルツハイマー病患者を同定する, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8209~8213, Yamatsuji, T., Matsui, T., Okamoto, T., Komatsuzaki, K., Takeda, S., Fukumoto, H., Iwatsubo, T., Suzuki, N., Asami-Odaka, A., Ireland, S., Kinane, T. B., Giambarella, U., およびNishimoto, I., APPの家族性アルツハイマー病関連変異体によって誘導されるGタンパク質媒介神経DNA断片化, *Science*, 272, 1349~1352, 1996, Cowburn, R. F., Wiehager, B., Ravid, R., およびWinblad, B., アセチルコリンムスカリン性M2レセプター刺激 $[^{35}S]$  GTP $\gamma$ S結合は、アルツハイマー病の死後の脳において領域選択変化を示す, *Neurodegeneration*

n、5、19～26、1996)。

【0074】

したがって、GNB3-825T対立遺伝子のキャリアは、アルツハイマー病の発症リスクが増加する。同時に、GNB3-825T対立遺伝子のキャリアに認められる3以下に記載の早発性アテローム性動脈硬化症は、アルツハイマー病の形成に寄与する。

11.勃起機能不全（インポテンス）の予測 性的刺激を受けた後の陰茎の勃起は、同時に起こる血液の流出量の減少と血液流入量の増加によって生ずる。血液流入量の増加に必要なメカニズムには、ホルモンの作用、即ちGタンパク質を経由して調停される作用が含まれる。

【0075】

合計で、勃起機能不全が証明されている63人の男性と照合のための健康体男性614人がGNB座825座について遺伝子型により分類された：【0076】

【表11】

【0077】

遺伝子型の分布は著しく異なっており（カイ二乗=8.7;2自由度、 $p=0.01$ ）、勃起機能不全の男性においては、825T対立遺伝子の度数の減少が19%へと著しく顕著である。この方法において、以下の勃起不全に関するリスク（オッズ比率；OR）を無作為抽出した照合グループとの比較において計算できる。

CC/TT、OR=4.0(95%CI:0.9-16.9; $p=0.04$ ) CC/TT、OR=2.0(95%CI:1.1-3.5; $p=0.01$ ) 従って、同型接合体C825対立遺伝子担体は、同型接合体825T対立遺伝子担体と比較した場合に4倍、異形接合体825T対立遺伝子担体と比較した場合には2倍の勃起不全が発達するリスクがある。更に異形接合体825T対立遺伝子担体に関するリスクは、同型接合体825T対立遺伝子担体と比較した場合約2倍である。

12.甲状腺機能障害の予測 高血圧、水腫形成そしていわゆる「HELIP シンドローム」は、妊娠に関して母親の生命と胎児の生命の両方に重大な危険を引き起こす。妊娠高血圧（妊娠中毒、子癇前症）を成長させる825T対立遺伝子担体には、早産（妊娠後37週間前の出産あるいは出産時の体重が2500gより少ない子供については14項も併せて参照されたい）の高い危険があることが判明しており、加えてこれらの子供たちには死産および出産後死のリスクがある。同時に825T対立遺伝子担体でありそして妊娠中毒を患っているの女性には、自然流産（習慣性流産）のリスクが増加する。

【0078】

従って、825T対立遺伝子を検出することは、妊娠中毒の母親の未出産児に関する死亡リスクの増加を予測するのに適している。

妊娠中毒（子癇前症）は、高血圧、水腫、および蛋白尿を伴って危険な状態である。妊娠中毒は、妊娠している母親のリスクを増大させるが、特に未出産児に関して問題となる。合計で、188人の妊娠中毒にかかっていない女性と191人の妊娠中毒にかかっている女性について検討した。ここでは、GNB3座における遺伝子状態と、内皮のNOシンターゼ（eNOS）をコードする遺伝子のGlu298Asp変異体に関連する遺伝子状態について検討した（Yoshimura 他、「内皮の酸化窒素シンターゼ遺伝子におけるミスセンスGlu298Asp変異体は日本人における冠状痙攣に関連している。」Hum Genet. 1998年6月号、103(1):65-9）。

【0079】

GNB3(TCあるいはTT遺伝子型)中の825T対立遺伝子が同時に存在することで、eNOSにおける298ASP変異体の同型接合体の存在は妊娠中毒のリスクを10倍以上とする。GNB3(TCあるいはTT遺伝子型)中の825T対立遺伝子が同時に存在することで、eNOSにおける298ASP変異体の異形接合体の存在は、

妊娠中毒のリスクを2倍とする。

14. 低体重出産の予測 出産時体重と、生涯においてかかる過剰体重、高血圧あるいは2型の糖尿病との間には逆の関係があることを示す経験的相関関係が存在することが認められている。ここでは、出産時体重の非常に低い人間が特にこれらの症状にかかりやすい傾向があることが示されている。それ故、825T 対立遺伝子を有する子供は、出産時に低体重で誕生するリスクが増加するかどうかについて検討した。低出産時体重は、全体重を全て分布した場合の四分値で最低のものと規定した。GNB3 座についての遺伝子型の分布を第1四分値と第2-4四分値との間で比較すると、同型接合体 C825 対立遺伝子担体と比較した場合の同型接合体 825T 対立遺伝子担体は、低出産体重のリスクが6倍に増加している(95%CI=1.3-28.6;  $p < 0.05$ ) (第1四分値対第2-4四分値)。そして、異型接合体 825T 対立遺伝子担体のリスクは2.4倍高い(95%CI=0.7-7.9)。

G beta3 遺伝子 825T 対立遺伝子と誕生時体重【0080】

【表12】

【0081】

それ故 GNB3 座についての遺伝子型分類の後に、低体重での出産および子宮内の成長減速に関して 825T 対立遺伝子担体に増加したリスクが割り当てられる。

15. 薬理遺伝 本発明のもう一つの主題は、GNB3-825T 対立遺伝子の薬理遺伝学、即ち遺伝子型の分類によって薬の作用を予測する可能性である。

【0082】

多くの薬(ホルモン、受容体作用物質)は、G タンパク質に結合している受容体を經由してその効果を働かせる。拮抗物質は、ホルモン受容体の相互作用をブロックする。

GNB3 座についての遺伝子型分類は、遺伝子型を使用した薬学的有効性の予測に適していることが確認されている。これはにホルモン、伝達物質(神経伝達物質を含む)に対するインビボでの応答性あるいは G タンパク質サブユニットの Gbeta3 および Gbeta3s 含んでいるかかる G タンパク質異性三重体を活性化する薬理学に関係する。これは、例えばベータアドレナリン作用物質のような G タンパク質サブユニットを刺激するホルモン、神経伝達物質あるいは薬物に追従する。同時に、これはベータアドレナリン 2 受容体における Arg16Gly 変異体および Gln27Glu 変異体の検出を同時に行うのに適用される。それ故、GNB3-825T 対立遺伝子の存在は、薬理遺伝が変更されたことを示しており(薬理的あるいは非薬理的な)治療の形式および高血圧、糖尿病蜜剤、冠心臓疾患、心臓異常のあるあるいは心臓異常の無い急性心筋梗塞症、心臓異常、移植体拒絶反応、勃起機能不全等における薬あるいはホルモンの投与について、特定の選択を考慮しなければならない。

15.1 エリスロポエチン この関連において、GNB3-825T 対立遺伝子の存在は血球生成にエリスロポエチンを投与する有効性の予測および免疫抑制治療(例えば、サイクロスポリンによる)期間における高血圧の進展の危険性と共に、この治療期間における高血圧発生の予測をもまた可能にする。

15.2 セロトニン受容体への作用物質 またこの関連において、偏頭痛発作の処置および予防に関する物質(セロトニン受容体への作用物質)の有効性について予測することができる。

【0083】

これは以下の事例によって証明される。アルファ 2 アドレナリン作用物質(BHT933)を発端者の歯冠内に適用したところ冠状血管が収縮した。この効果は、血管のこれらの部分を通る流量変化によって定量的に証明された。図8に示すように、GNB3-825T 対立遺伝子の担体における冠状血管の流量の強烈な減少が、冠状心臓疾患(CHD)の有無に関係なく観察された。これは GNB3-825T 対立遺伝子中の担体におい

て、これら薬の作用の増大を予測できることを意味している。

15.3 ベーターアドレナリン受容体遮断薬 GNB3 座に関する遺伝子型活用のもう一つの例は、ベーターアドレナリン受容体を遮断する物質の有効性に関する予測である。ここにおいて、若くて健康な 825T 対立遺伝子担体（同型接合および異形接合）は、同型接合 C825 対立遺伝子担体に比較して心拍出量を増加させたことを述べておきたい（TC/CC=92.9±4.1ml(n=30); CC=74.7±4.0ml(n=19); $p<0.01$ ）。ベーターアドレナリン受容体遮断プロパノール薬を静脈内に投与した後、心拍出量は同型接合 C825 担体では平均 3ml の投与で減少したが、これに反して同型接合および異形接合の 828T 対立遺伝子担体では 12ml の投与で減少した（ $p<0.05$ ）。825T 対立遺伝子担体でも同じように強烈な心拍出量の減少が認められた。

従って、CBN3 C825T 状態を確立することで、ベーターアドレナリン受容体遮断薬の薬学-生理学的作用を予測できる。これは指摘したプロパノール薬のような非選択性ベータ遮断薬のみならず全てのベーターアドレナリン受容体にも関連するので、選択性のベータ 1 およびベータ 2 の受容体遮断薬にも関連性がある。

15.4 プロスタグランジン E1 勃起機能不全が存在する場合、プロスタグランジン E1 を海綿体に注射することは、診断的究明のためだけでなく長期間の治療の開始となる可能性がある。プロスタグランジン E1 は、アデニル酸シクラーゼを活性化させ、そしてそれに引き続く caMP の形成は円滑な血管筋細胞を緩め、そしてこれによって動脈性の血液流が増大しその結果陰茎が勃起する。その際の勃起の程度は、ポイントシステム（スコア 0-5）によって定量的に示すことができる。スコア 4 および 5 は、貫通に十分な勃起力に相当し、スコア<4 は不十分であると考えられる。

【0084】

陰茎機能不全の男性 87 人に、10 マイクログラムのプロスタグランジン E1 を投与し勃起スコアを定量化した。その結果、遺伝子型分布は以下の通りであった。十分な勃起：TT=3、TC=15、CC=16（GNB3 825T 対立遺伝子の度数；30.9%）、不十分な勃起あるいは勃起せず：TC=3、TC=16、CC=34（GNB3 825T 対立遺伝子の度数；20.8%）。同様にプロスタグランジン E1 を投与下後の同型体接合 C825 対立遺伝子担体に、ドップラ音波測定器で測定した動脈血流量増大に減少が認められた。

【0085】

このように、プロスタグランジン E1 を注入しても十分な勃起が得られないという約 2 倍のリスクが同型体接合 C825 対立遺伝子担体に対して与えられる。

16. Gbeta3 反応抑制物質 本発明のもう一つの主題は、Gbeta3s 接合変異体を阻害する薬品の製造である。

【0086】

基本的に、例えば、タンパク質の分解を促進するかあるいはヒト G タンパク質のアルファおよびベータサブユニットとの相互作用あるいは結合を阻害することによって、Gbeta3s タンパク質の機能をその誘導によって阻害する化学物質を合成することが可能である。これら物質を同定するには選別システムが必要である。これを行うのには、Gbeta3s サブユニット単独あるいは Sf9 インセクト細胞における異なる Galpha あるいは Gbeta との組み合わせ、トランスフェクションに適したその他の細胞、あるいは再構成システムにおける G-タンパク質-結合受容体の存在下あるいは存在無しで精製した Galpha および Gbeta3s サブユニットの使用の発現が適している。これらシステムを使用して、例えば、Galpha サブユニットに対する GTP の受容体-媒介結着についての化学物質の作用が検討でき、これによって最後には Gbeta3s サブユニットの機能を阻害する化学物質を識別することができる。かかる試験システムの一つは、基本的に物質の宿主を試験するための「高処理能力選別システム」として使用することもできる。

【0087】

Gbeta3s-3 タンパク質の第 2 接合変異体（Gbeta3s-2） GNB3 遺伝子の更なる解析によって、Gbeta3s-2

と呼ばれるヒト異型三量体における Gbeta3s サブユニットの別の接合変異体が発見された。

これを行うために、GNB3 における C825 に関して同型接合体 (CC 遺伝型) あるいは C825T 多型性に関して異型接合体 (TC 遺伝子型) および cDNA 中の逆転写反応によって転写された個体の中性親和性顆粒球から、mRNA を標準的方法で抽出した。Gbeta3 に関してコードする cDNA は、重合酵素連鎖反応によって増大された。

ここでは、以下のプライマーを使用した。

【0088】

センス : 5'-gcc gtc aga ctt tca ctg gc-3' アンチセンス : 5'-tgt tca ctg cct tcc act tcc - 3' これらプライマーの位置は、遺伝子のエクソン 9 の領域中に一つのプライマーがあり、一方では他のプライマーが 3' 非変換領域中のエクソン 11 に存在するように選択した。

【0089】

使用した PCR 条件は、5 min; 94°C - 1 min., 60°C - 45 sec, 72°C - 7 min. であった。

PCR 生成物は、0.5×TBE+0.1 ミクロン/ml 臭化エチジウム中の 2.5% アガロースゲル中で分離しそして紫外線の下で視覚化した。サイズマーカーとしては pBR322DNA/Alu I を使用した。

【0090】

図 13 で明らかになるように、cDNA のポジション 825 上に T 対立遺伝子を運んでいる (異型体あるいは同型体の) 個体中の細胞において、その他の特殊な短縮型 RT-PCR 生成物が検出された。

短縮型 PCR 生成物は、Gbeta3 遺伝子の新しい接合異変体を代表するものであることが判明した。これの代表を附属書 3 に示す。以前に Levine その他 (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T.Jr., Helman, L.J., および Ahn, T.G. 「Beta 3 サブユニットの分子クローニング、G タンパク質ベーターサブユニットポリペプチドの第三の形態」 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87(6), 2329-2333(1990)) によって記述されたように、cDNA の完全なシーケンスが示されている。ここでは、著者によって最初に規定されたナンバリングを保持しているので、開始ゴドン ATG は核シーケンスのポジション 6 に割り当てられている。

【0091】

以前に記述した、825T 対立遺伝子の担体中の遺伝子代替結合で生じたヌクレオチド 504-626 (もしもナンバリングが ATG 開始コドンで開始されたならば 498-620 に該当する) の遺伝子欠失について記述している。附属書 3 では、この分野は「Gbeta3s における遺伝子欠失」と呼ばれている (Siffert, W., Rosskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., および Horsthemke, B. 「ヒト G タンパク質ベーター 3 サブユニット変異体の高血圧症との関連」 Nat. Genet. 18(1):45-48, 1998)。ここで再度記述している遺伝子欠失は、遺伝子のエクソン 10 で生じ、以前に記述した C825T 多形体を含んでおり、そして 129 ヌクレオチドで構成される。これはタンパク質面における 43 のアミノ酸損失に相当する (附属書 3 では、Gbeta3s-2 における遺伝子欠失」と呼ばれている)。オープン読みとりフレームは保存されている。遺伝子欠失の正確な位置は、反復性シーケンスのため明確に確認することはできない。ヌクレオチド 708-836 あるいはヌクレオチド 712-840 は除外できる。もしも開始コドンが 1 で固定されているならば、ヌクレオチド 702-830 あるいは 706-834 は除外される。この遺伝子欠失の正確な位置を知ることは、新しい cDNA とアミノ酸シーケンス Gbeta3s-2 に関して重要ではない。附属書 3 では、更に多形体ポジション C825T および C1423T について示している。Levine 他に従って最初のナンバリングを使用したので、附属書 3 における C825T 多型体はポジション 831 に、そして C1234T 多型体はポジション 1249 に示されている。Caucasians のほぼ 1-3% で生じた新しい T657A 多型体が、更なる並び替えで発見された。

【0092】

Gbeta3s-2 の新しい cDNA シーケンスは、アミノ酸シーケンスと一緒に附属書 4 に示す。

G タンパク質ベータサブユニットは、WD 反復性タンパク質のファミリーに属している。これらベータサブユニットは非常によく保存される。これらのベータサブユニットは、7 枚のプロペラ翼を有するプロペラに類似した空間構造を形成することが知られている (Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D.C., Hamn, H.E. および Sigler, P.B. 「2.1 解像度における G タンパク質ベータガンマ二量体の結晶構造」 *Nature* 379:369-374, 1996)。Gbeta3s-2 で生ずる遺伝子欠失に基づき、7 枚の回転翼の代わりに 6 枚の回転翼を有する Gbeta3-s に類似した新しいサブユニットが形成されることが予測できる。これを図 14 に図式的に示す。同時に Gbeta3-s において以前に発見された遺伝子欠失についても示してある。

#### 【0093】

まず最初に、Gbeta3s-2 を含む G タンパク質異型トリマーが機能的に活性かどうかを検討した。以前の記述と同じく、この目的のために Sf9 インセクト細胞システムを使用した (Siffert, W., Roskopf, D., Siffert, G., Busch, S., S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., および Horsthemke, B. 「ヒト G タンパク質ベータ 3 サブユニット変異体の高血圧症との関連」 *Nat. Genet.* 18(1):45-48, 1998)。細胞は Galpha12, Ggamma12 および m2-ムスカリンアセチルクロリン受容体でもって移入した。透過可能な細胞に対する 35S-GTPgammaS の結合が、カルバコールでの刺激 (100 ミクロン M) の後定量化された。ここにおいて、35S-GTPgammaS の特定の取り込みは、G タンパク質アルファサブユニットの活性化手段である。図 15 に示すようにベータサブユニットが不在の場合は、わずかな G タンパク質の活性化が観察されただけである。Gbeta3 あるいは Gbeta3s が移入された後は、G タンパク質の活性化は明らかに強まった。Gbeta3s の方が Gbeta3 より有効であった。新しい接合異性体 Gbeta3s-2 が、アゴストンカルバコールによって生じた G タンパク質活性化の最も強い強化作用を導く。従って、プロペラ翼の一つが欠失しているにもかかわらず、Gbeta3s-2 は機能的に活性でありそして G タンパク質を強化された活性化へと導きさえすることが同時に示されている。それ故、以前の所見では、また 825T 対立遺伝子を運んでいる個体における細胞中の G タンパク質の強化された活性化能力を証明したことを説明した。((Siffert, W., Roskopf, D., Siffert, G., Busch, S., S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., および Horsthemke, B. 「ヒト G タンパク質ベータ 3 サブユニット変異体の高血圧症との関連」 *Nat. Genet.* 18(1):45-48, 1998)。Pietruck, F., Moritz, A., Montemurro, M., Sell, A., Busch, S., Roskopf, D., Virchow, S., Eche, H., Brockmeyer, N., Jakobs, K.H., そして Stiffer, W., 「基本的高血圧症において G タンパク質によって選択的に高められたセルラー信号、Galpha12, Galpha13, Gs1 および Gs2 は変化しない。」 *Circ. Res.* 79:974-983, 1996。Siffert, Roskopf, D., Moritz, A., Wieland, T., Kaldenberg-Stasch, S., Kettler, Hartung, K., Bechmann, S., および Jakobs, 「基本的高血圧症を有する患者からの固定化されたリンパ母細胞における強化された G タンパク質の活性化」 *J. Clin. Invest.* 96:759-766, 1995。Wirchow, S., Ansorge, N., Ruebber, H., Wiffert, G., および Siffert, W., 「G タンパク質ベータ 3 サブユニット 825T-対立遺伝子を運んでいる個体からの強化された fMLP-誘導老化性中性親和」 *FEBS Lett.* 436(2): 155-158, 1998)。

#### 【0094】

異型三分子体 G タンパク質が、フォスホオリパーゼ Gbeta の異なるイソフォームを刺激できるということは一般的に知られていることである。この酵素は、リン脂質を分割する。例えばフォスファダイニロジトール-4,5-ビスフォスフェートを、「第 2 メッセンジャー」分子のイノシトール-1,4,5 トリフォスフェート (IP3) と 1,2-ジアクリルグリセロール (DAG) へと分解し、IP3 はカルシウムイオンを細胞貯蔵所から放出させ、一方 DAG はタンパク質キナーゼ C の別のイソフォームを活性化する。それ故、フォスホオリパーゼ C の活性化は細胞活性化の重要なステップである。Gbeta3s-2 を含むベータガンマサブユニット

が、フォスホリパーゼ C $\beta$ 3 (PLC $\beta$ 3) を活性化できるかどうかを調査した。これを実行するのに、タンパク質のトランジット移入に関して一般的にアクセス可能な文献においてしばしば使用されている COS-7 細胞システムを使用した。これらの細胞には PLC $\beta$ 、G $\gamma$ 12 および異なる G $\beta$  サブユニットを移入した。細胞は放射線により前処理し、[3H]イノシトールの標識付けをした。イノシトールリン酸塩 (IP) の生成を標準的方法を使用して定量化した。生成された IP の量が PLC の活性化の尺度を示す。図 16 で示すように、G $\beta$ 3、G $\beta$ 3s、および G $\beta$ 3s-2 を含むベータガンマ二量体は PLC $\beta$ 3 を活性化できる。同様に、G $\beta$  を移入後の PLC $\beta$ 3 の活性化を比較のために示してある。

#### 【0095】

これらの検討は、G $\beta$ 3s-2 が典型的な細胞イフェクターシステムの刺激作用を起こすことができることを証明する。従ってこれは十分に機能的なタンパク質であり、強化された細胞活性化能力を、825T 対立遺伝子を運びそしてこのタンパク質の形質を表現する個体に割り付けることができる。

発見した接合異変体 G $\beta$ 3s-2 は、タンパク質を抑制するかあるいは G タンパク質アルファあるいはガンマサブユニットとの相互作用を阻害する化学物質の開発あるいは試験する目的で製造される該当するタンパク質によって役立つように使用することができる。

#### 【0096】

特に治療の分野では、発見した接合異変体の知識の範囲内において、持続的あるいは一時的に細胞あるいは組織を形質移入することが良い考えである。同様に、治療目的において G $\beta$ 3s-2 接合異変体は、人間あるいは動物の細胞あるいは組織中に形質表現することができる。

附属書 3 に示す cDNA の核酸シーケンスのその他の利用は、拡散シーケンス検出のために遺伝子プローブを開発することである。

#### 【0097】

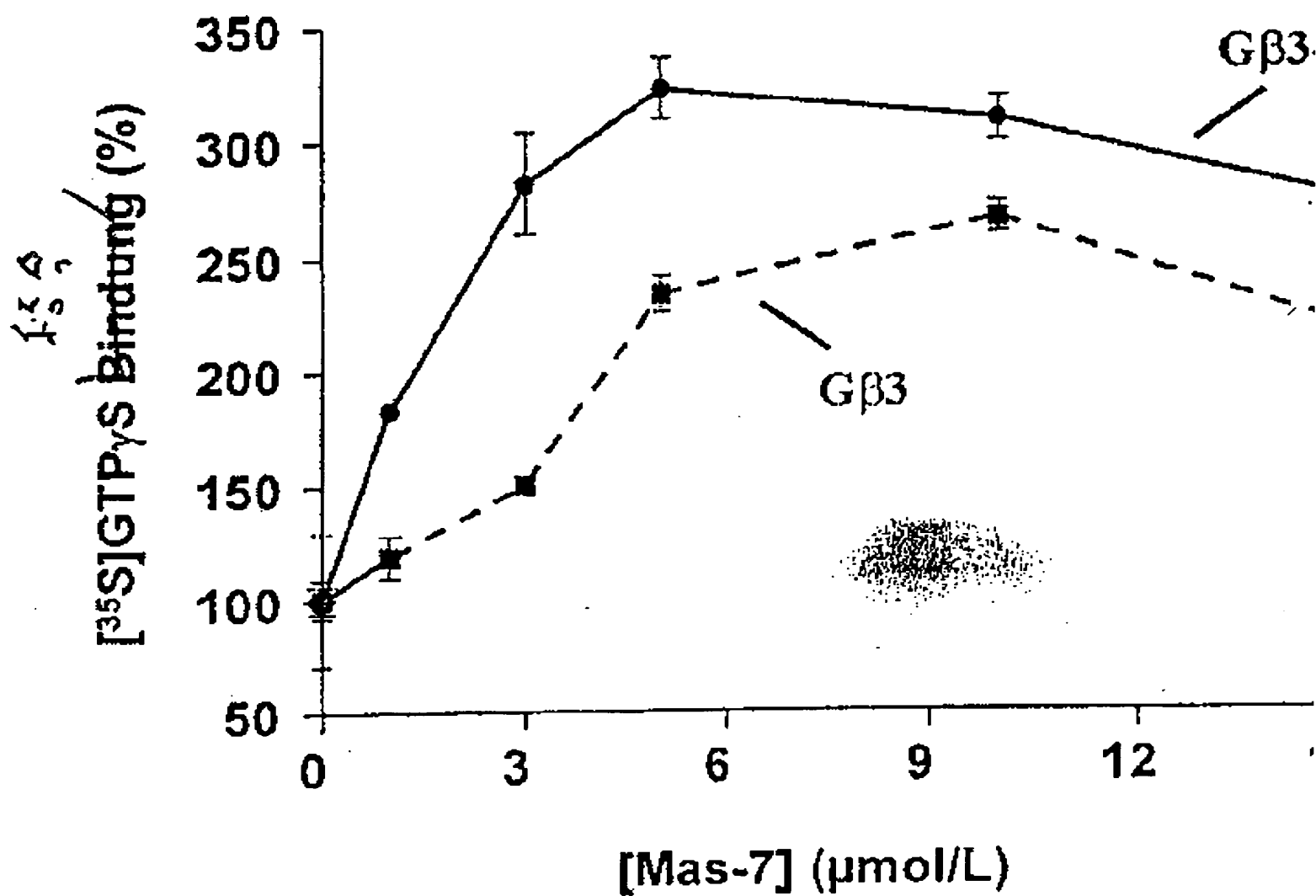
更に、アンチセンス構成成分 (オリゴヌクレオチド) は、G $\beta$ 3s-2 接合変異体の合成を抑圧する目的で、細胞あるいは組織に導入することができる。

また、アンチセンス構成成分はこれらの細胞あるいは組織に別なベクター (遺伝子工学によって変化したウイルス) の目的で導入することもできる。

【0098】【表 13】、【0099】【表 14】、【0100】【表 15】、【0101】【表 16】、【0102】【表 17】、【0103】【表 18】、【0104】【表 19】、【0105】【表 20】、【配列表】



Fig. 1



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 2

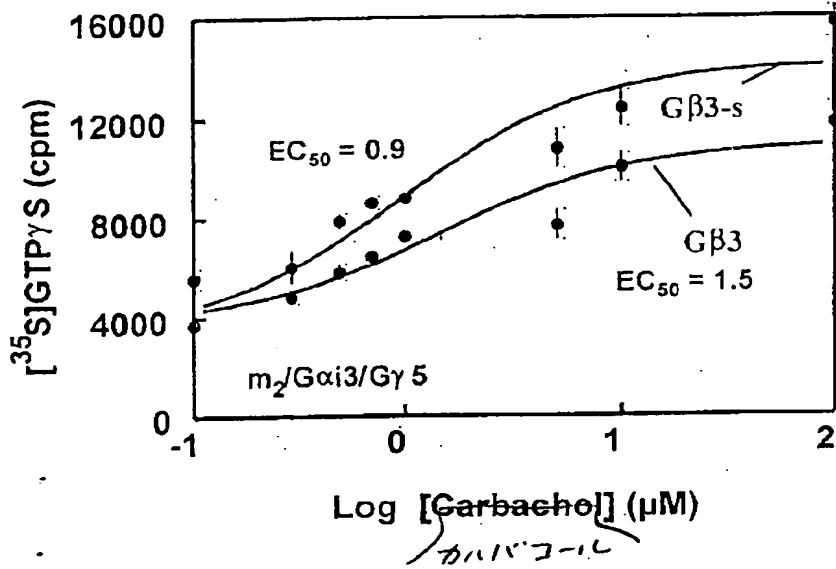


Fig. 3

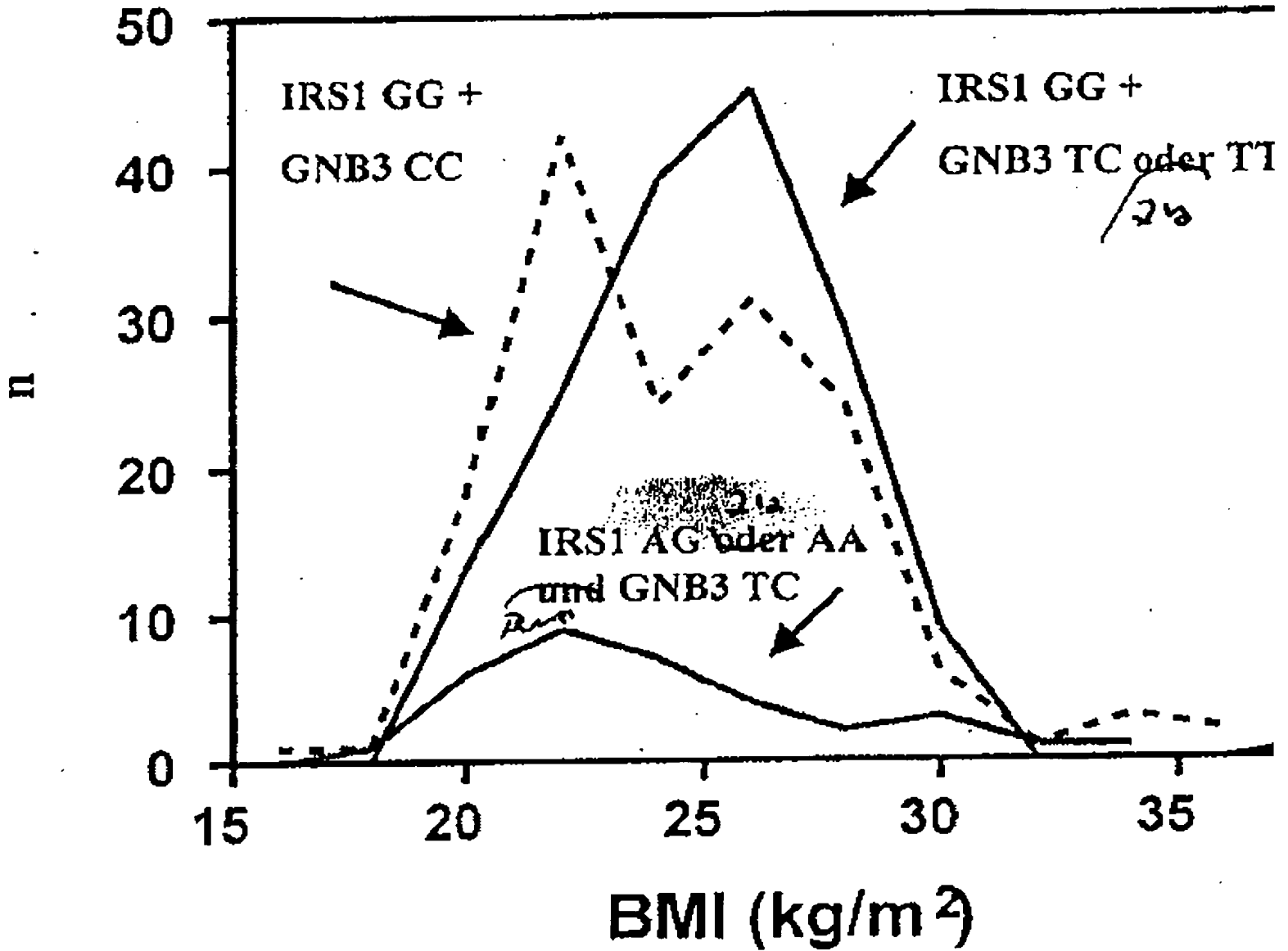
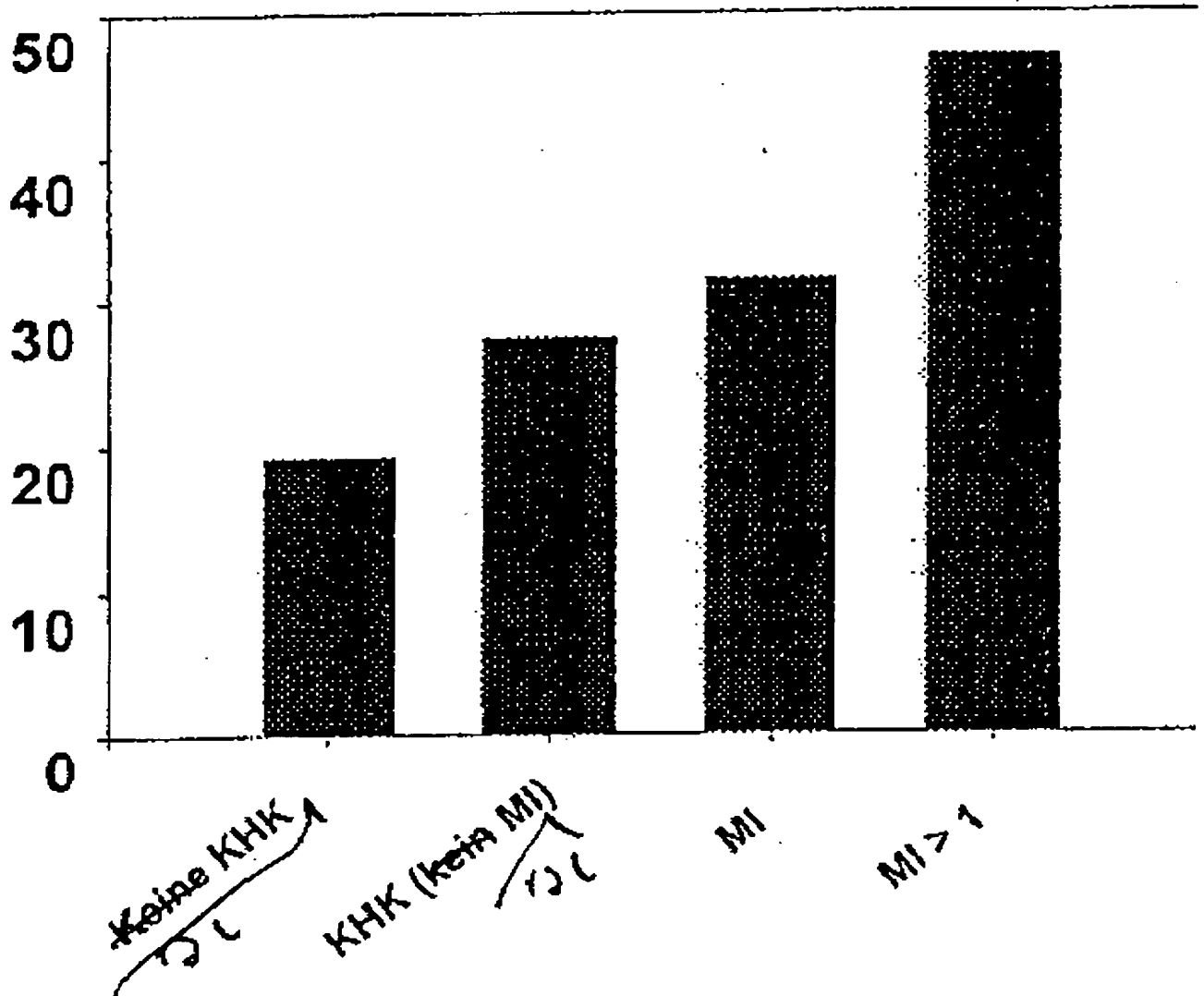


Fig - 4

725Tの割合

Frequenz des 825T Allels [%]



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 5

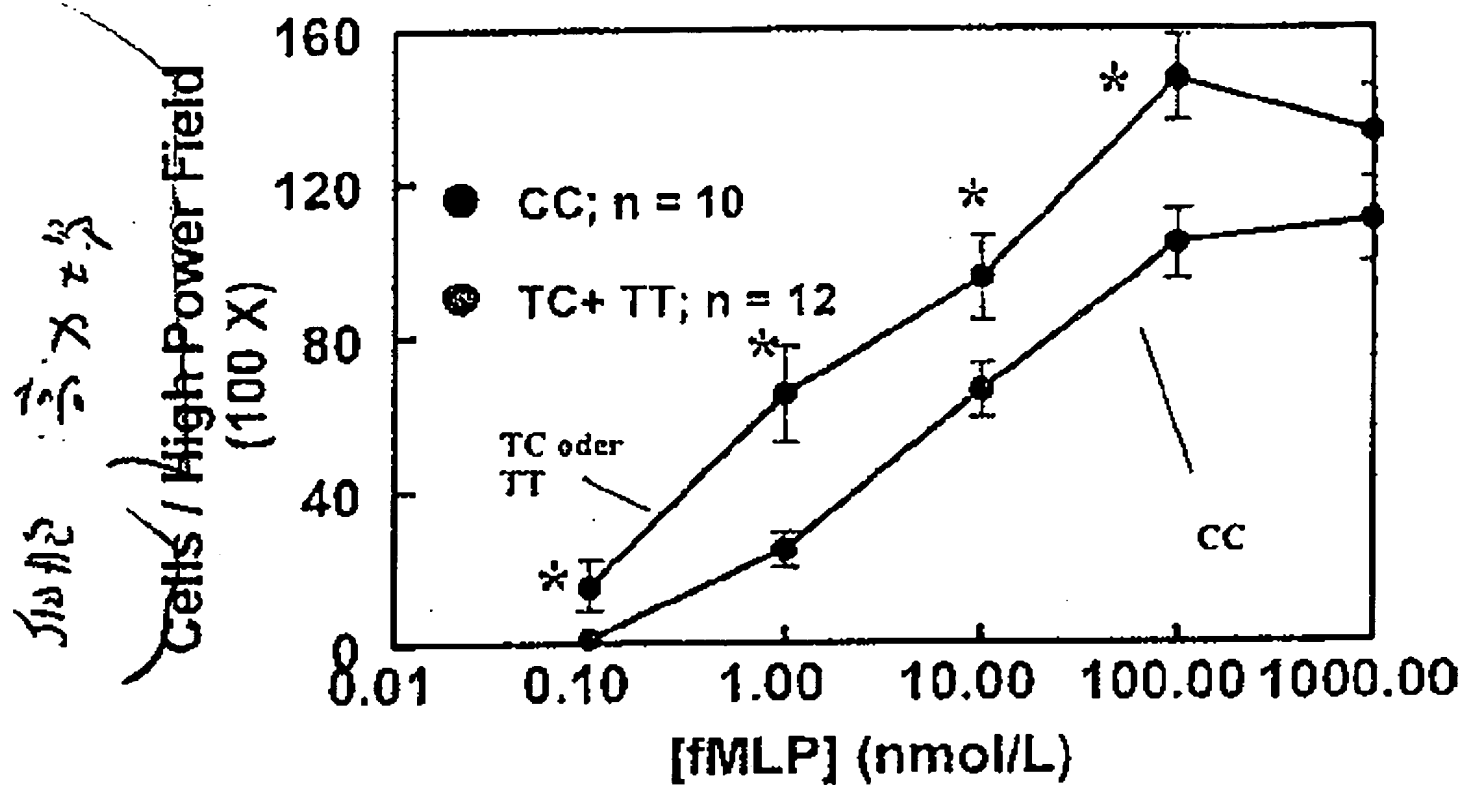


Fig. 6

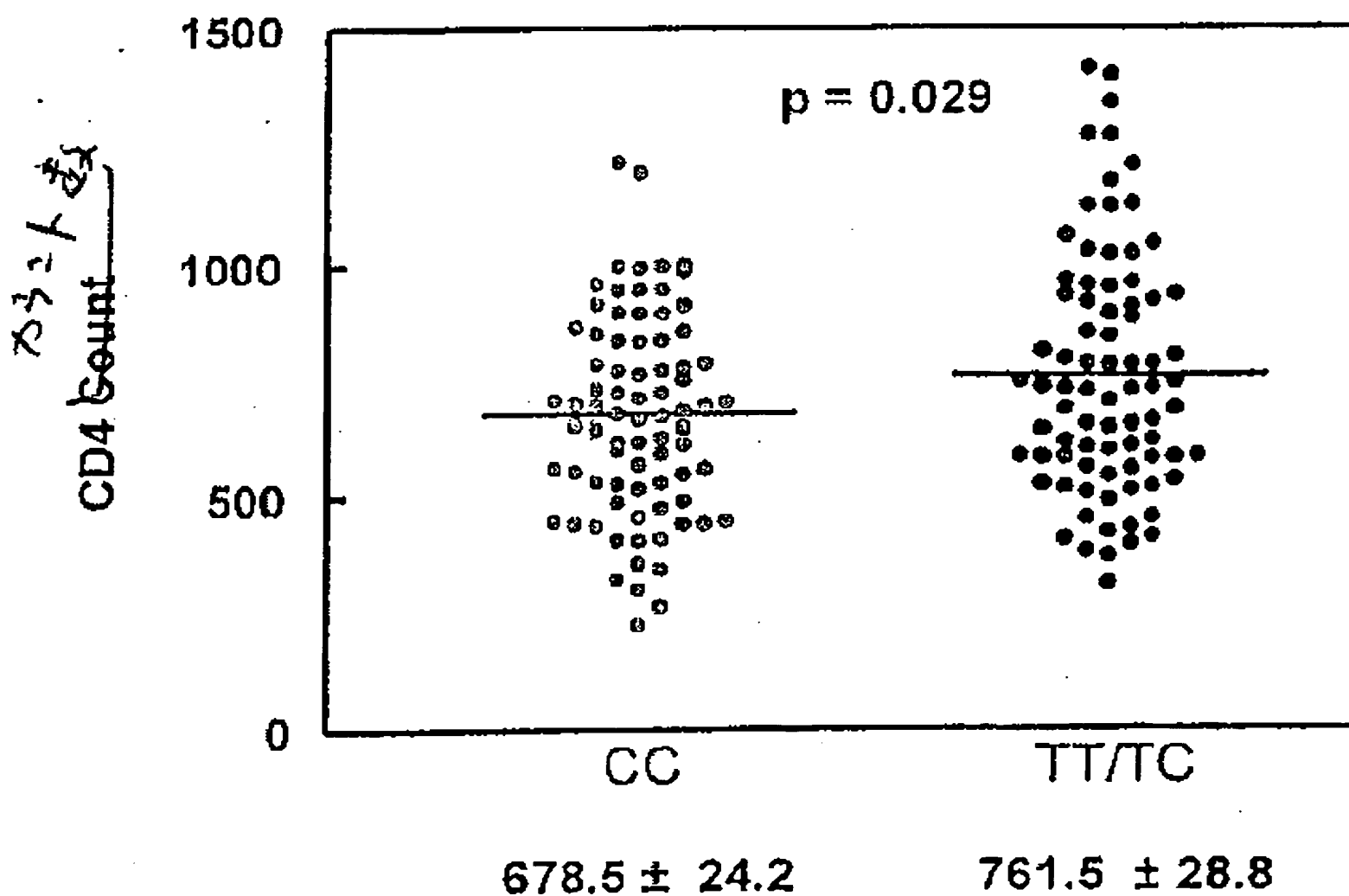


Fig. 7

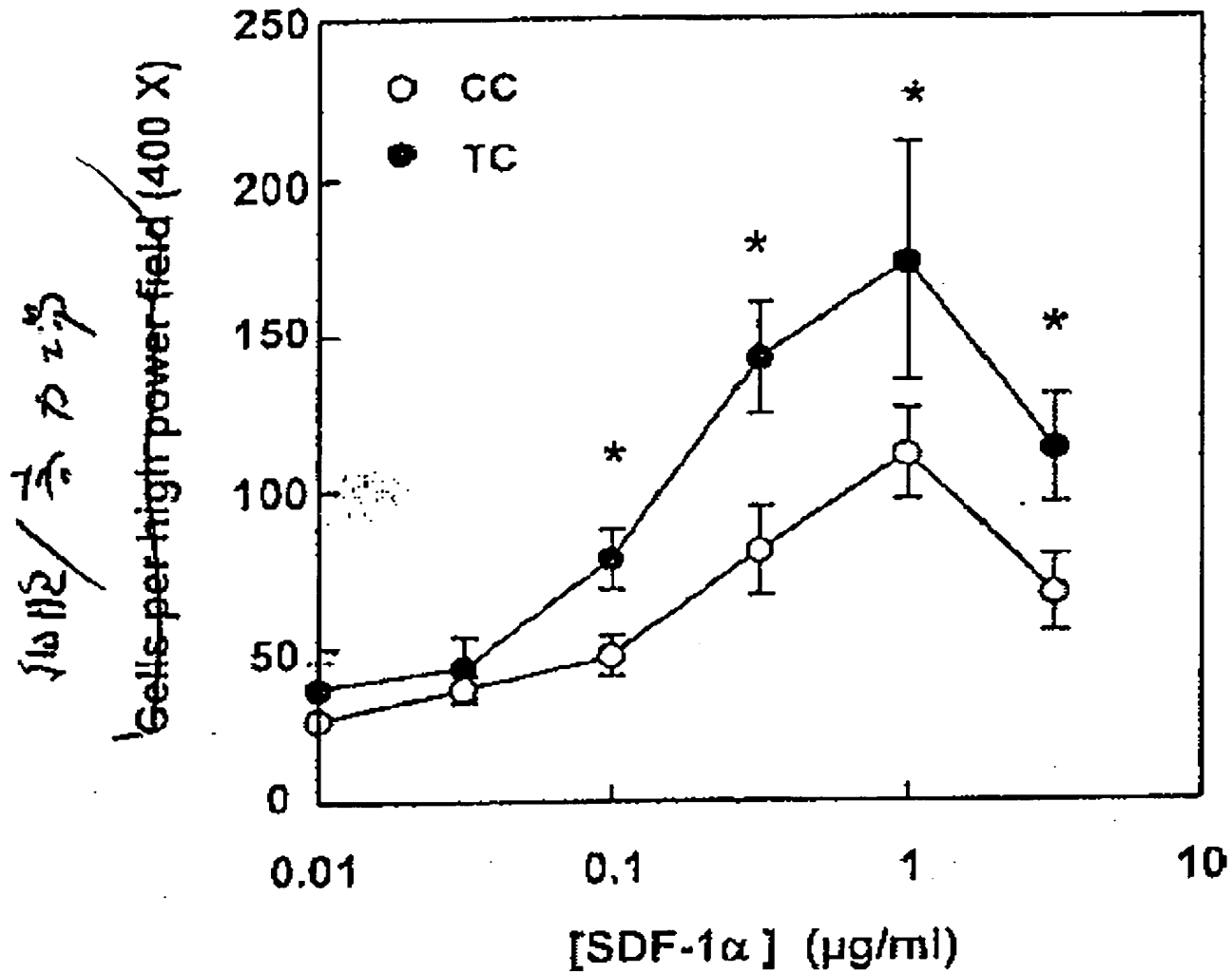


Fig. 2

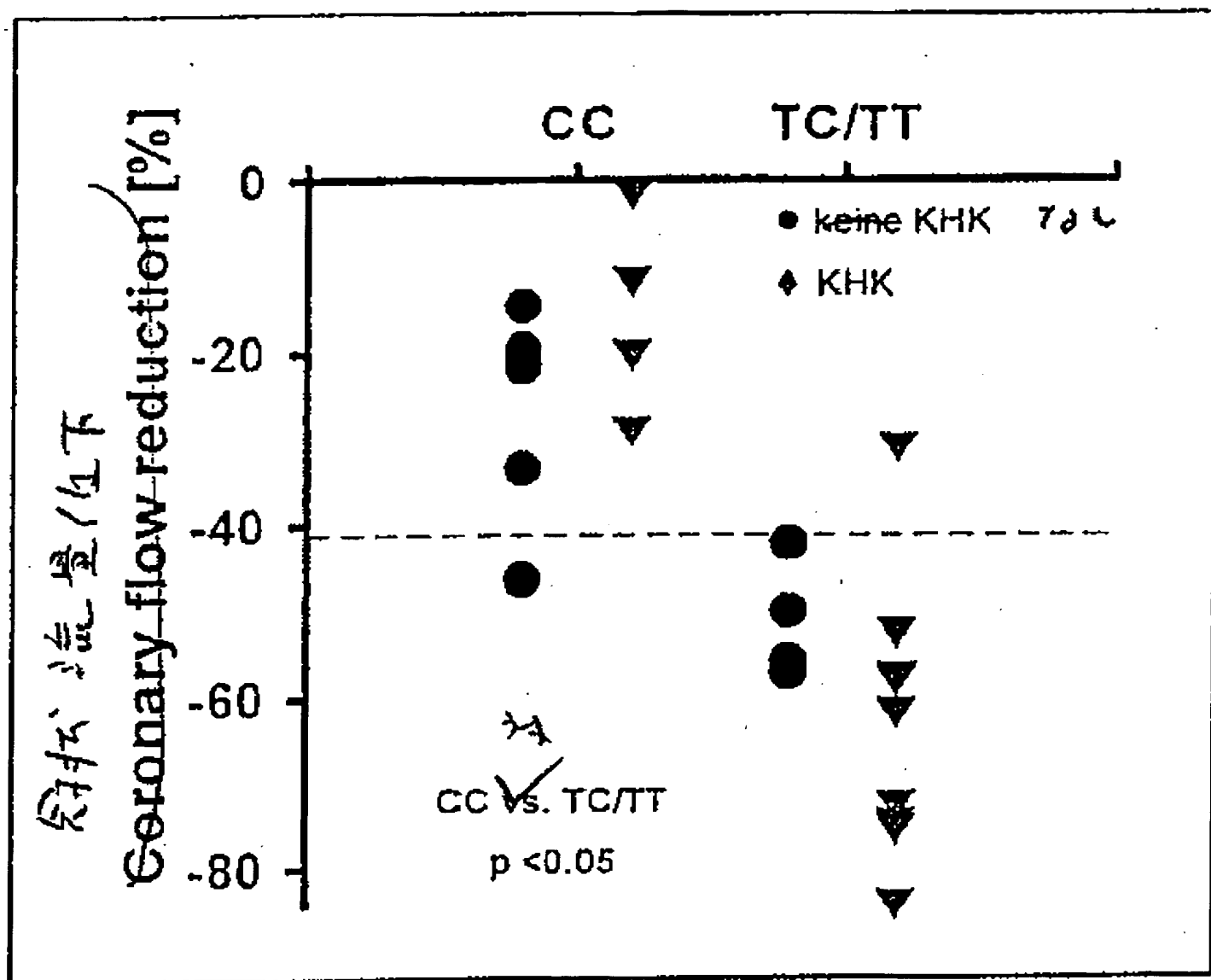




Fig. 9

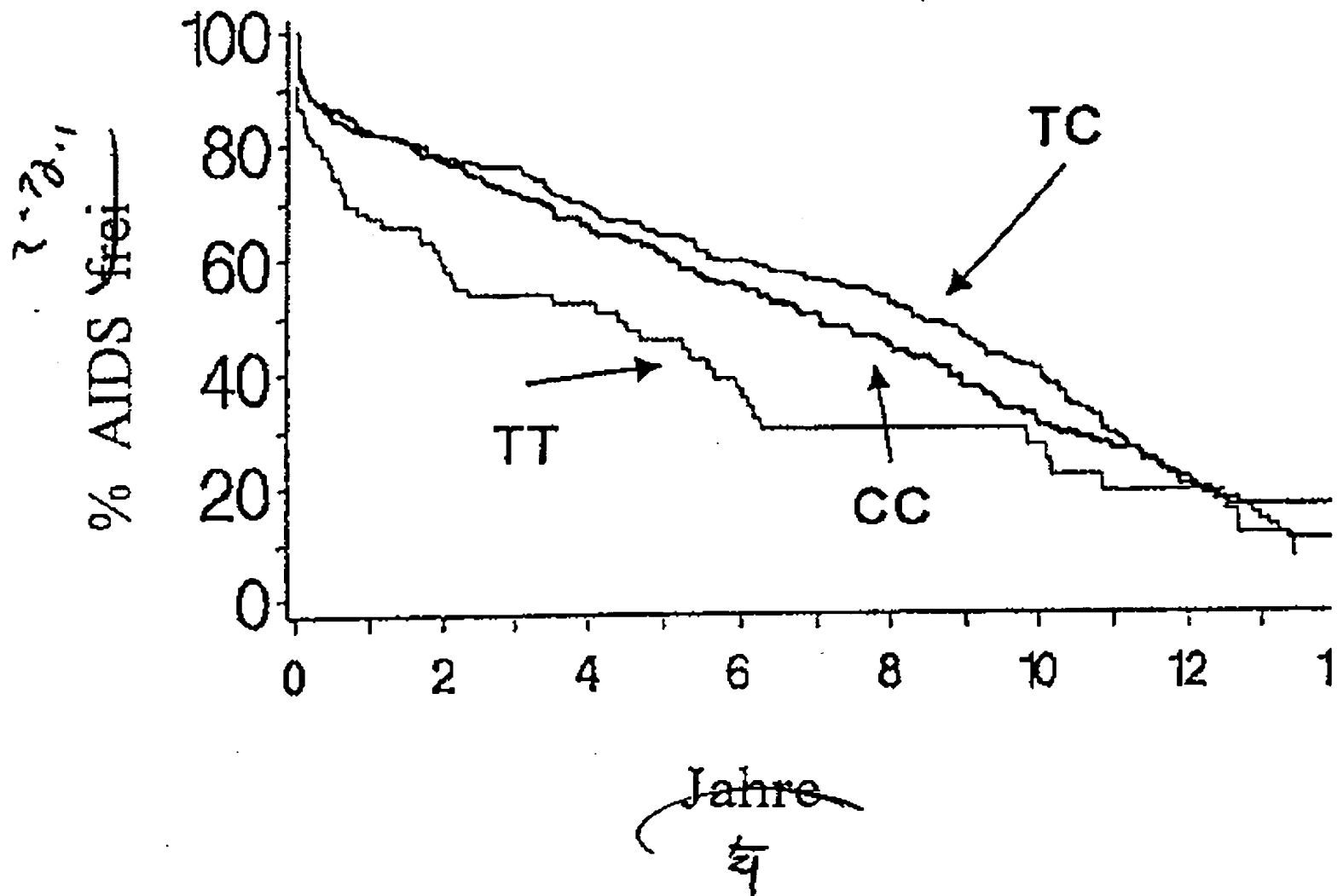


Fig. 10

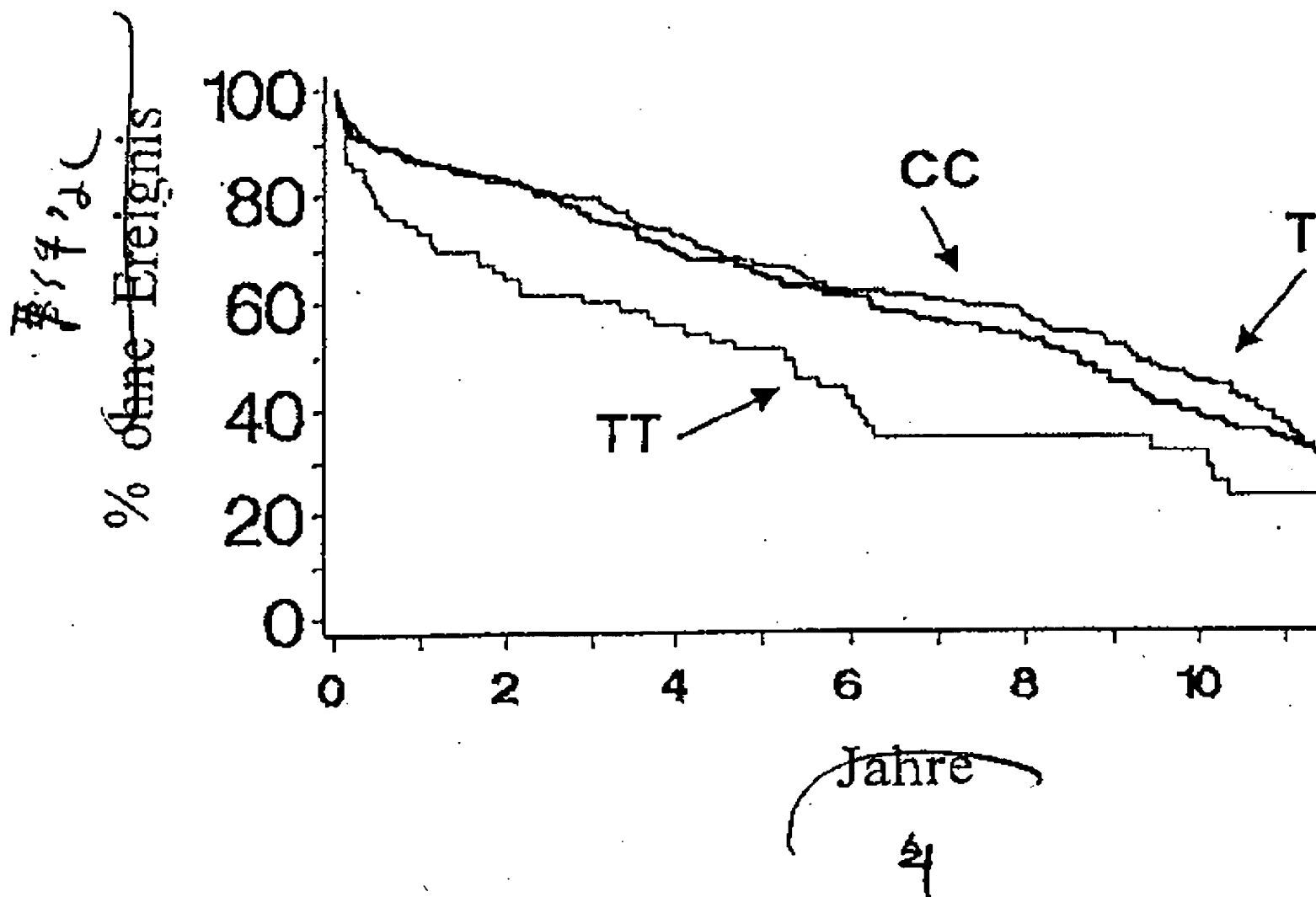


Fig. 11

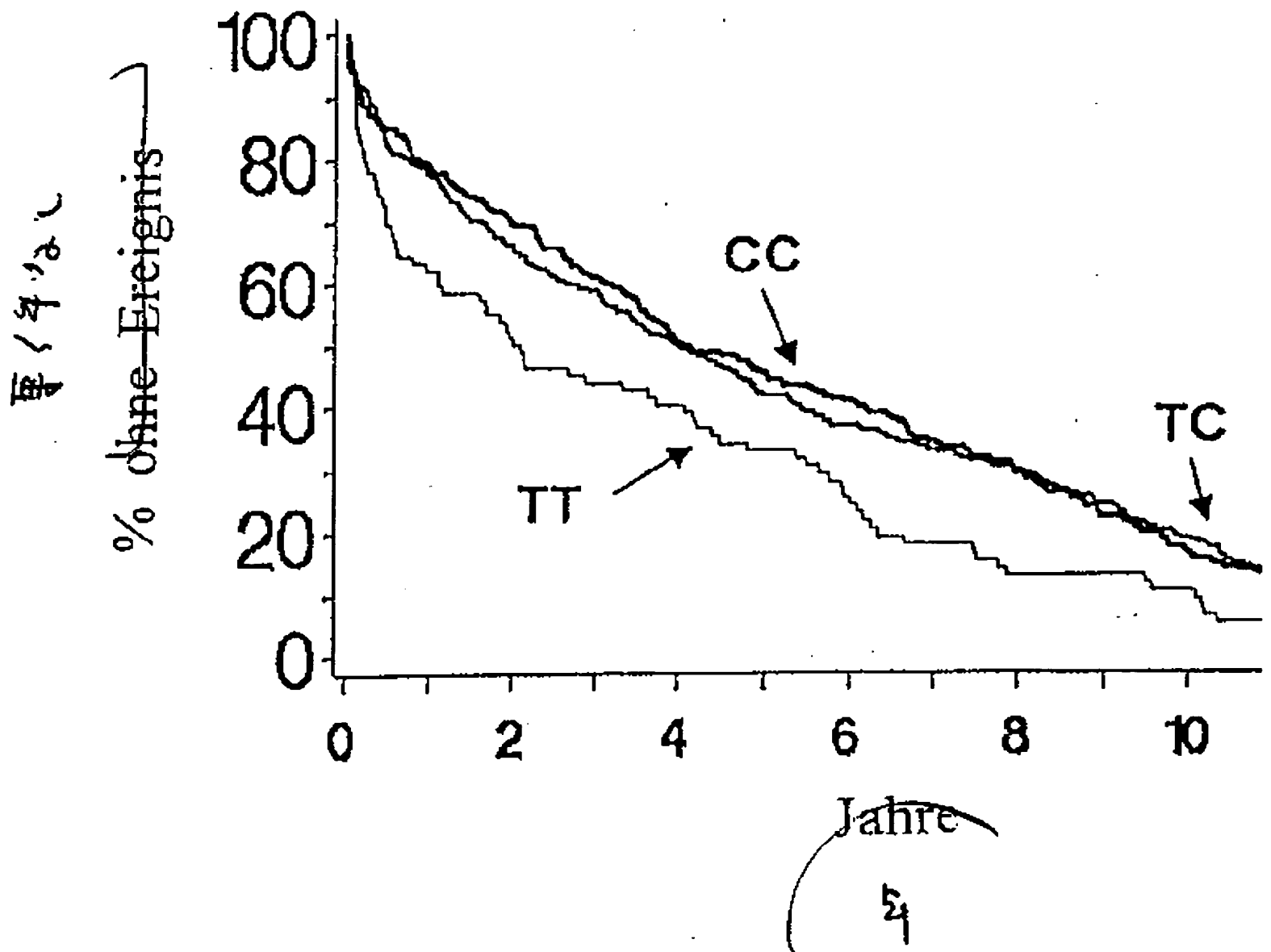


Fig. 12

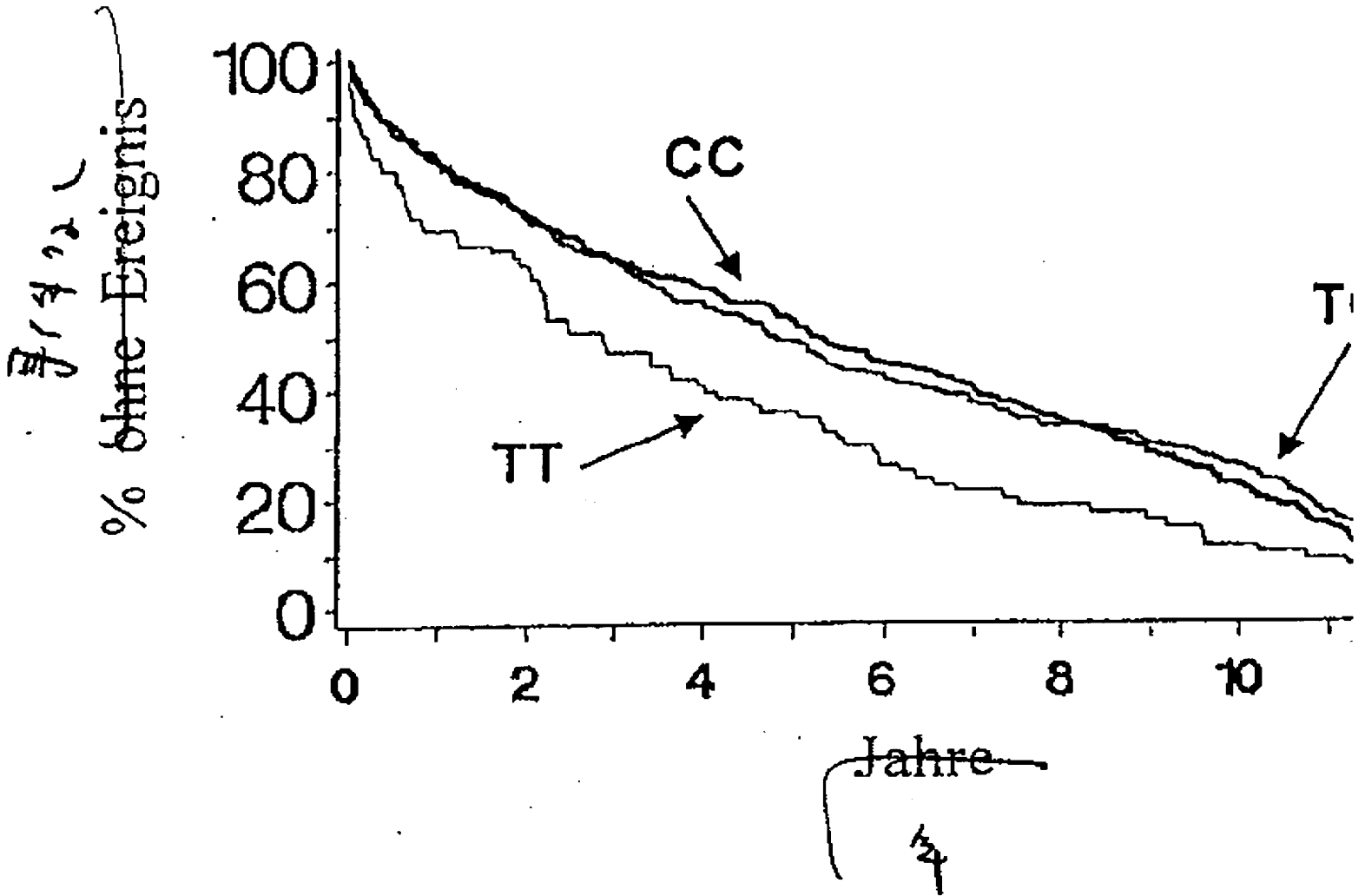
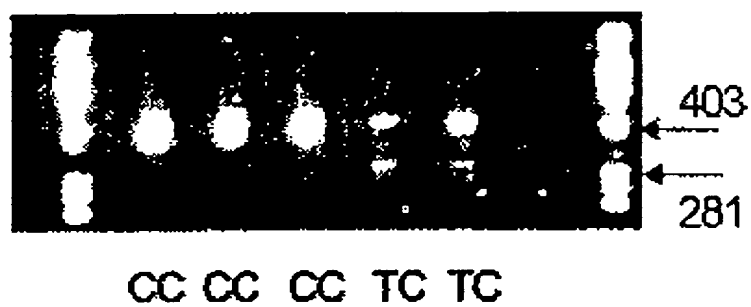
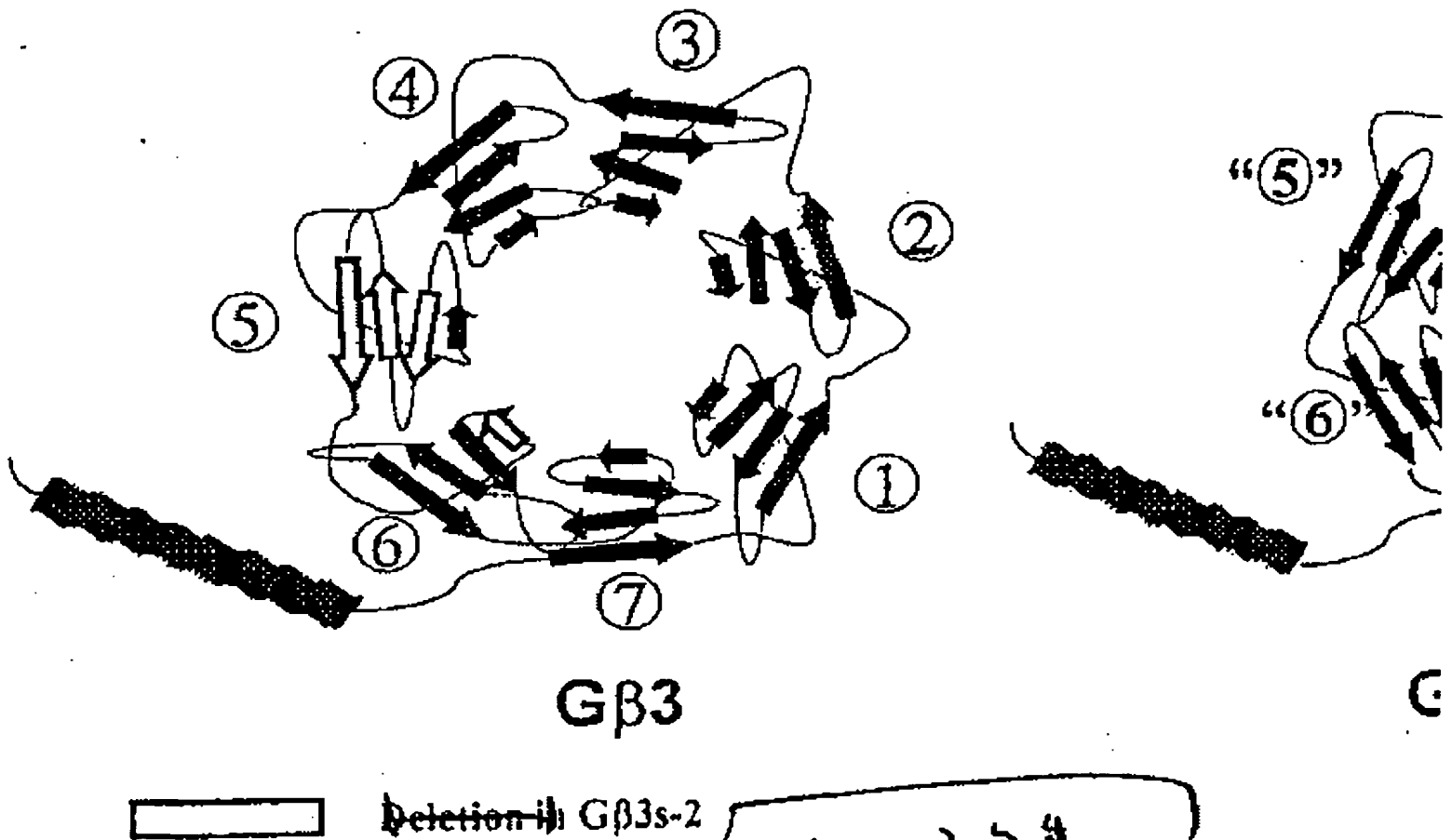


Fig. 13



BEST AVAILABLE COPY

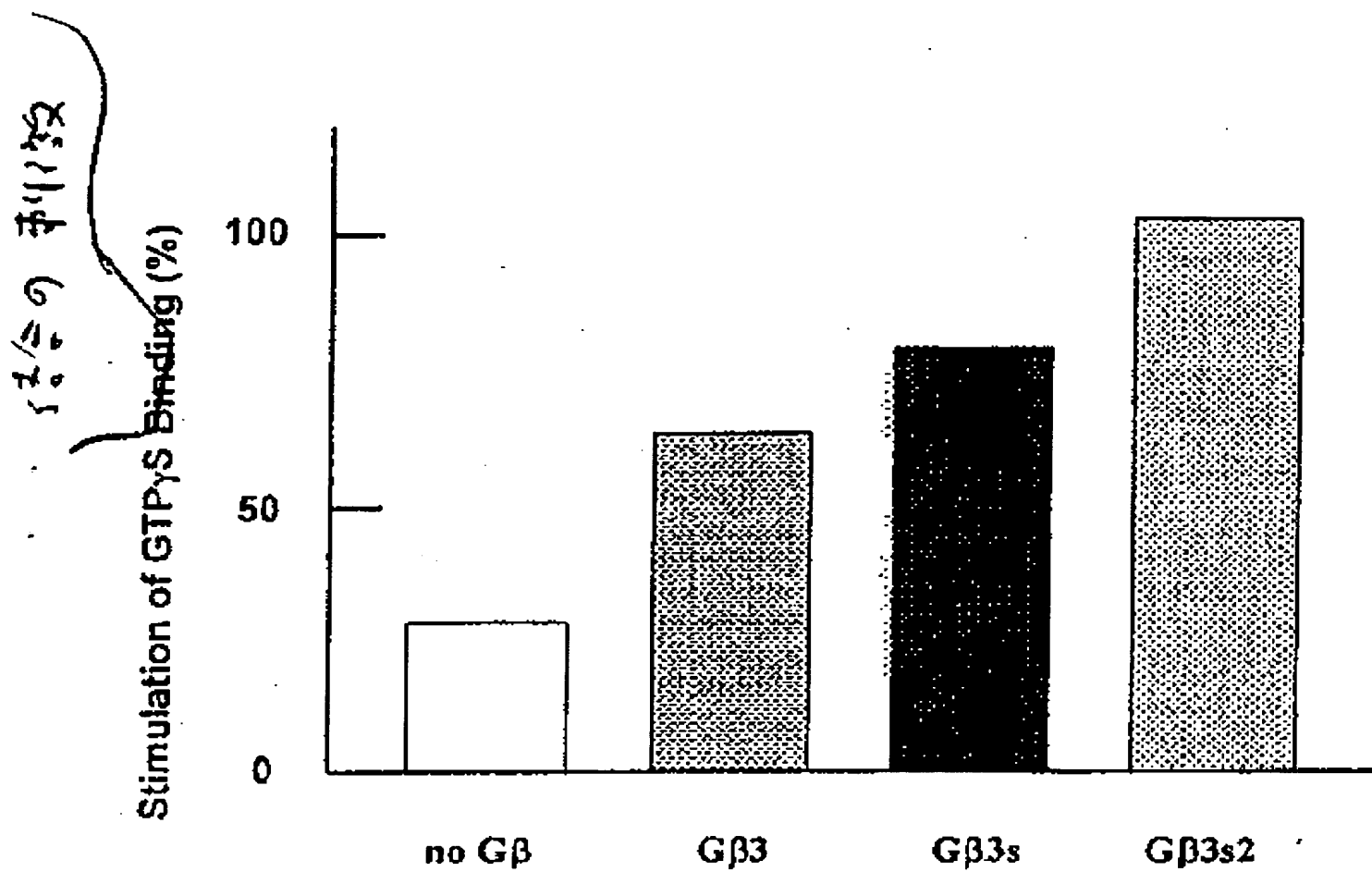
Fig. 14



にみ+2欠失

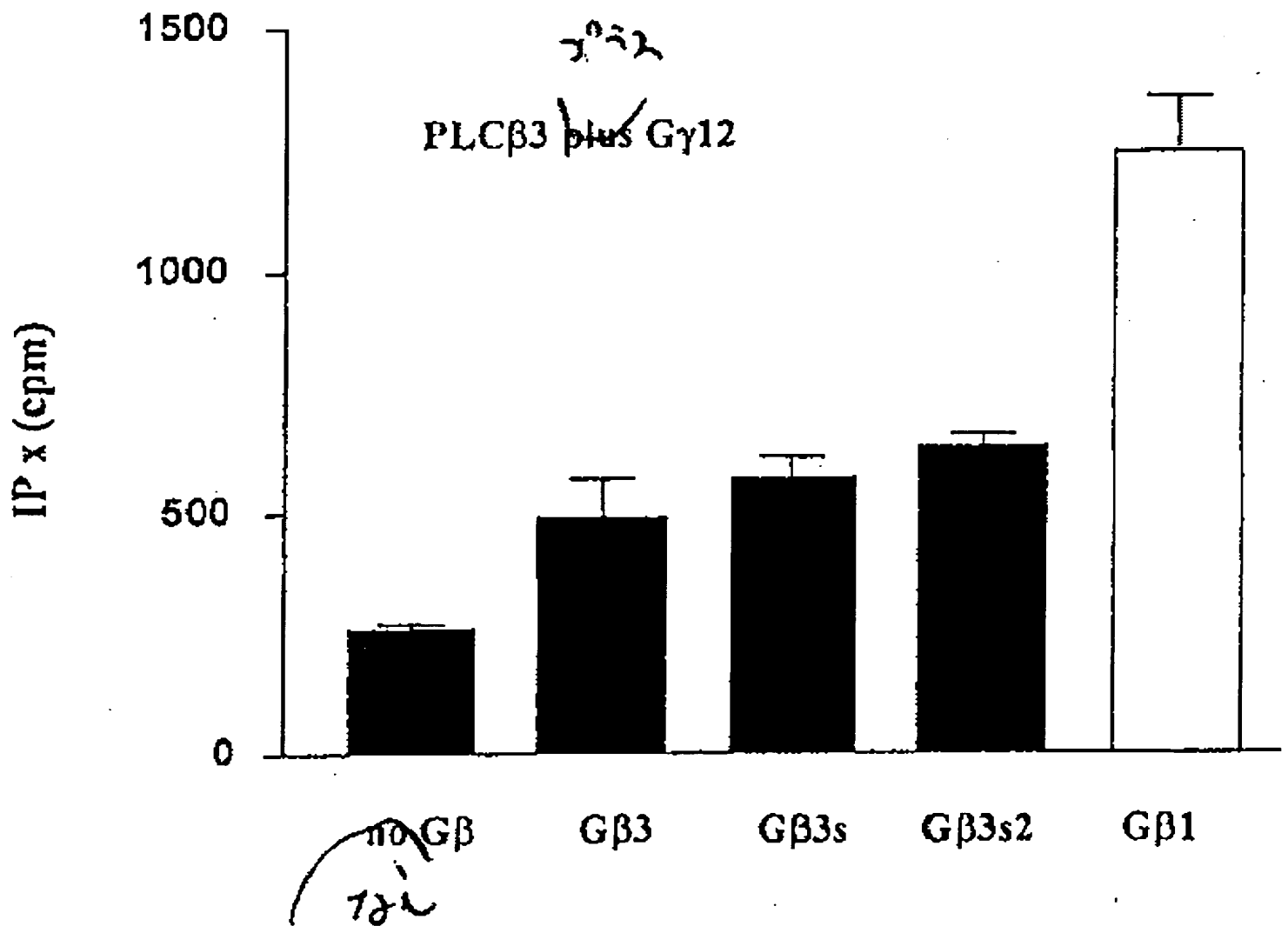
BEST AVAILABLE COPY

Fig. 15



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 16



BEST AVAILABLE COPY